

УДК 541.12.038.2:536.75:536.728

СПЕКТРОСКОПИЯ ЯМР И АНИЗОТРОПИЯ ХИМИЧЕСКИХ СДВИГОВ ^{13}C В ТВЕРДОЙ ФАЗЕ L- α -Ala-DL-Val

И.З. Рахматуллин, А.Р. Юльметов, А.В. Аганов, В.В. Клочков

Аннотация

В статье представлены результаты исследования пространственного строения дипептида L- α -Ala-DL-Val в твердой фазе методом спектроскопии ЯМР ^{13}C CP/MAS. С использованием одно- и двумерной ЯМР (COSY и HSQC) спектроскопии проведено отнесение сигналов ЯМР ^1H и ^{13}C дипептида L- α -Ala-DL-Val, растворенного в воде (D_2O). Описаны спектры ЯМР ^{13}C CP/MAS (125.69 МГц) дипептида, приведены результаты сравнительного анализа величин химических сдвигов ^{13}C αCH или αCH_2 углеродных атомов дипептида L- α -Ala-DL-Val в растворе и порошке. Определены значения компонентов тензоров химических сдвигов атомов углерода в обоих аминокислотных остатках (L- α -Ala и DL-Val) для дипептида L- α -Ala-DL-Val в твердой фазе.

Ключевые слова: олигопептиды, ЯМР ^1H и ^{13}C спектроскопия, двумерная ЯМР (COSY и HSQC) и ЯМР ^{13}C CP/MAS спектроскопия, химический сдвиг, анизотропия, тензор.

Введение

Хорошо известно, что биологическая активность протеинов связана с их пространственным строением. Изучение конформаций олигопептидов, содержащих в цепи от двух и более аминокислотных остатков, важно в том плане, что их можно рассматривать в качестве структурных блоков протеинов и знание их строения может быть использовано для предсказания конфигурации цепей полипептидов. Известно также, что некоторые короткие пептидные последовательности, синтезируемые клеткой, являются частью иммунной системы живого организма [1–4].

Данные о координатах атомов протеинов в подавляющем большинстве случаев определяются методом рентгено-структурного анализа в твердой фазе. Отсюда задача определения структурных параметров олигопептидов в твердой фазе независимыми методами имеет важное практическое значение.

Интерпретация большинства экспериментальных результатов ЯМР твердого тела протеинов требует хорошо охарактеризованных тензоров анизотропии химических сдвигов ЯМР ^{13}C аминокислотных фрагментов [5]. Знание тензоров химических сдвигов ядер $^{13}\text{C}(\alpha)$ и $^{13}\text{C}(\beta)$ в примыкающих цепях белков является существенным при изучении структуры и динамики белков с использованием ЯМР-спектроскопии. К сожалению, в литературе подобная информация представлена скудно, что говорит о важности экспериментального определения тензоров анизотропии химических сдвигов ЯМР ^{13}C атомов углерода, входящих в различные наборы аминокислотных остатков.

Целью настоящей работы являлось определение и анализ тензоров анизотропии химических сдвигов ^{13}C в порошкообразном образце дипептида L- α -Ala-DL-Val (L- α -аланин – DL-валин) на основе данных CP/MAS ЯМР ^{13}C спектроскопии.

Экспериментальная часть

Регистрация ЯМР ^1H (500 МГц) и ^{13}C (125.69 МГц) спектров проводилась на ЯМР-спектрометре высокого разрешения AVANCE-500 фирмы «Bruker». Спектрометр работает в режиме внутренней стабилизации поля по линии резонанса дейтерия (^2H). При записи протонных спектров в изотропном растворителе (D_2O) использовали 90° -импульсы и насыщение сигнала воды либо 30° -импульсы без насыщения сигнала растворителя. Задержки между импульсами составляли 2 с, число накоплений – от 4 до 100, ширина спектра – 11 м.д., число точек – 26832. При записи спектров ЯМР ^{13}C использовали 30° -импульсы и развязка от протонов (WALTZ-16). Задержки между импульсами равнялись 2 с, число накоплений – 19485, ширина спектра – 236.6 м.д., число точек – 65536. При обработке спектра применяли цифровую экспоненциальную фильтрацию с константой 3 Гц. Одномерные спектры регистрировались при стабилизированной температуре 25 °С.

Спектры ЯМР ^{13}C CP/MAS (125.69 МГц) дипептида в твердом состоянии (порошок) снимали при комнатной температуре на том же ЯМР-спектрометре. Регистрация спектров проводили при различных скоростях вращения. Число накоплений – от 64. В качестве внешнего стандарта использовали ЯМР-сигнал алмадмантана.

Обсуждение результатов

В качестве образца исследования был взят дипептид, состоящий из двух аминокислот L- α -аланина и DL-валина. Структурная формула дипептида L- α -Ala-DL-Val приведена на рис. 1.

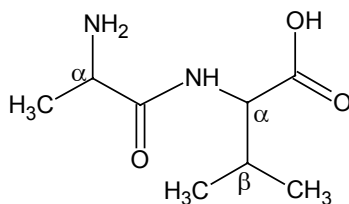


Рис. 1. Структурная формула дипептида L- α -Ala-DL-Val

Основным источником уширения линий ЯМР в твердых телах является диполь-дипольное взаимодействие ядерных спинов. Спектральную информацию об анизотропии этих взаимодействий можно получить только из спектров ЯМР твердых тел (монокристаллов), но в них линии широкие, и, следовательно, положения линий в большинстве случаев не могут быть измерены с точностью, достаточной для извлечения необходимой информации. Для экспериментального получения такого рода информации был разработан целый ряд методов [5].

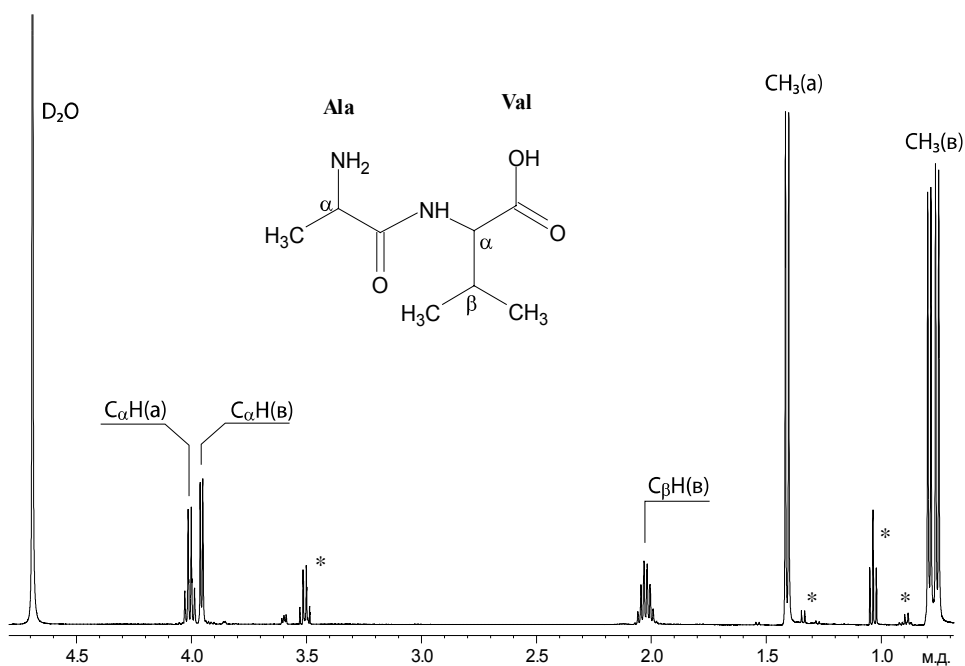


Рис. 2. ЯМР ^1H (500 МГц, AVANCE-500, «Bruker») спектр дипептида L- α -Ala-DL-Val в растворе D_2O . $T = 298$ К, 0 м.д. соответствует сигналу ЯМР ^1H TMS; сигналы, отмеченные буквой «а», относятся к аланину, «в» – к валину, звездочкой обозначены сигналы примесей

Для достижения поставленной в работе цели была проведена серия экспериментов:

а) запись одномерного спектра ^1H ЯМР дипептида L- α -Ala-DL-Val в растворе D_2O (относительная простота в расшифровке ЯМР-спектра);

б) проведение двумерного эксперимента ЯМР ^1H - ^1H COSY L- α -Ala-DL-Val в растворе (для определения констант косвенных спин-спиновых взаимодействий между близлежащими протонами и отнесения спектральных линий к соответствующим ядрам молекулы);

в) регистрация одномерных спектров ^{13}C ЯМР в растворе D_2O и двумерного спектра HSQC для ядер ^{13}C и ^1H (для отнесения спектральных линий к соответствующим парам ядер ^{13}C и ^1H молекулы);

г) запись одномерных спектров ЯМР ^{13}C КП/ВМУ поликристаллического (порошка) образца дипептида L- α -Ala-DL-Val (образец вращается вокруг оси, расположенной под углом $54^\circ 44'$ к направлению внешнего магнитного поля).

На рис. 2 приведен ЯМР ^1H спектр дипептида L- α -Ala-DL-Val в растворе D_2O . В спектре ЯМР ^1H присутствуют многочисленные расщепленные сигналы, обусловленные сложной химической структурой соединения. Здесь имеются сигналы от примесей, находящихся в растворе D_2O : при $\delta = 1.05$ м.д. и при $\delta = 3.5$ м.д., так как если принять интегральную интенсивность сигнала $\text{C}_\alpha\text{H(a)}$ ($\delta = 4.0$ м.д.) за единицу, то интегральные интенсивности этих сигналов окажутся много меньшими единицы. При значении $\delta = 4.7$ м.д. наблюдается самый интенсивный сигнал, и без сомнения можно предположить, что это сигнал от незамещенных протонов в растворителе (D_2O). Сигналы от групп OH, H_2N

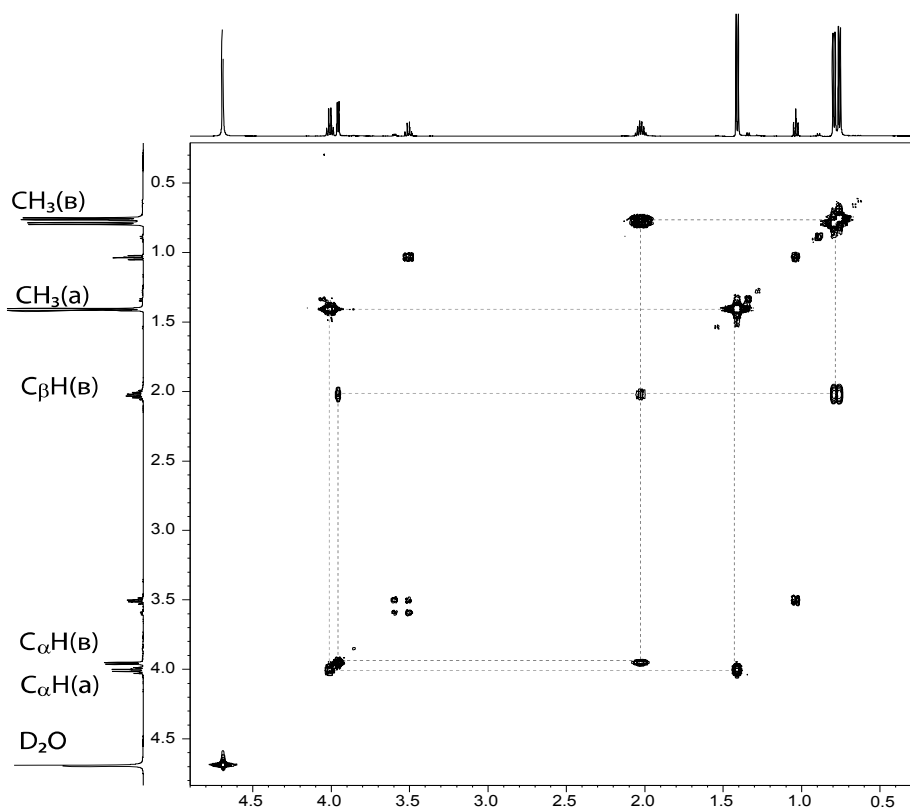


Рис. 3. ЯМР ^1H - ^1H COSY (500 МГц, AVANCE-500, «Bruker») спектр дипептида L- α -Ala-DL-Val в растворе D_2O . $T = 298 \text{ K}$

и NH в спектре не наблюдаются вследствие быстрого обмена с ядрами дейтерия (^2D) растворителя. Отнесение сигналов для CH- и CH_3 -групп для разных молекул основано на литературных данных [6–8], согласно которым сигналы при значениях химического сдвига от 0 до 1.5 м.д. в спектре ЯМР принадлежат CH_3 -группам, а сигналы в остальной области спектра ЯМР – CH-группам.

Более детальное определение положения линий, соответствующих CH_3 - и CH-группам было осуществлено с использованием данных двумерного эксперимента ЯМР ^1H - ^1H COSY (рис. 3). Кросс-пики, наблюдаемые в двумерном ЯМР ^1H - ^1H COSY спектре, обусловлены спин-спиновым взаимодействием между близлежащими группами протонов. В структуре дипептида присутствуют три CH_3 -группы: два от аминокислотного остатка Val и один от остатка Ala. В правой области спектра при $\delta = 0.5$ м.д. (рис. 2) имеются два близко расположенных дуплета. В предположении, что это сигналы CH_3 -групп от Val, так как эта область спектра лежит в диапазоне CH_3 -групп для Val [7–9] (в дипептиде имеется только две близко расположенные CH_3 -группы). На основании анализа кросс-пиков можно уверенно считать, что сигнал с $\delta = 2.0$ м.д. относится к группе $\text{C}_\beta\text{H}(\text{B})$, а сигнал с $\delta = 3.9$ м.д. – к $\text{C}_\alpha\text{H}(\text{B})$ от Val. Аналогично было сделано отнесение линий $\text{CH}_3(\text{A})$ ($\delta = 1.4$ м.д.) и $\text{C}_\alpha\text{H}(\text{A})$ ($\delta = 4.0$ м.д.) к группам протонов аминокислотного остатка Ala (сигналы, отмеченные буквой «а», относятся к аланину, «в» – к валину).

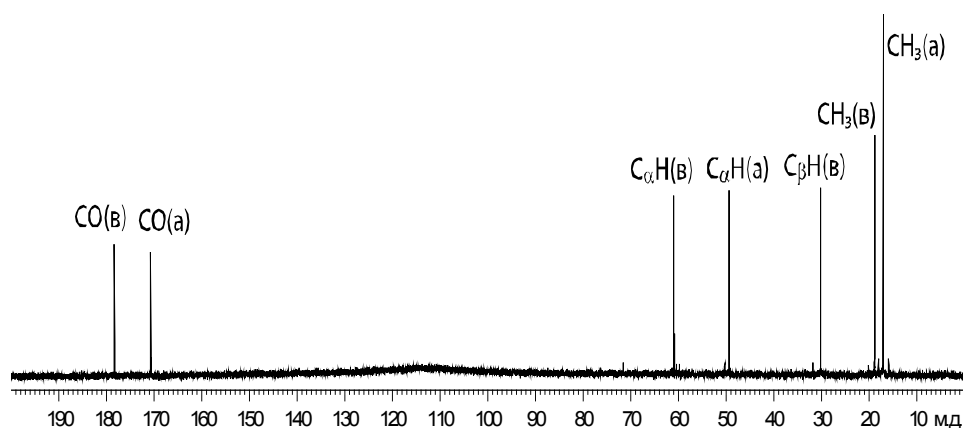


Рис. 4. ЯМР ^{13}C (125.69 МГц, AVANCE-500, «Bruker») спектр дипептида L- α -Ala-DL-Val в растворе D_2O . $T = 298 \text{ K}$, 0 м.д. соответствует сигналу ЯМР ^{13}C TMC

На рис. 4 приведен ЯМР ^{13}C спектр дипептида L- α -Ala-DL-Val в растворе D_2O . Углеродные ядра метильных групп $\text{CH}_3(\text{a})$ и $\text{CH}_3(\text{b})$ резонируют при $\delta = 17.0$ и 20.0 м.д., $\text{C}_\beta\text{H}(\text{b})$ – при $\delta = 30.0$ м.д., $\text{C}_\alpha\text{H}(\text{a})$ – при $\delta = 50.0$ м.д., $\text{C}_\alpha\text{H}(\text{b})$ – при $\delta = 61.0$ м.д. Карбонильные атомы углеродов имеют химические сдвиги $\text{CO}(\text{a})$ при $\delta = 170.0$ м.д., а $\text{CO}(\text{b})$ – при $\delta = 180.0$ м.д. Отнесение сигналов к соответствующим ядрам ^{13}C дипептида L- α -Ala-DL-Val сделано с помощью двумерного эксперимента HSQC [10, 11] для ядер ^{13}C и ^1H (рис. 5), который позволяет идентифицировать спектральные линии соответствующих пар ядер ^{13}C и ^1H молекулы (сигналы расположены напротив соответствующих пар ядер).

Отнесение сигналов ЯМР ^{13}C углеродных атомов $\text{C}=\text{O}$ в соответствующих аминокислотных фрагментах было проведено на основе двумерных ЯМР ^1H - ^{13}C HNBC экспериментов [11].

На рис. 6 приведены ЯМР ^{13}C спектры в растворе D_2O и CP/MAS ЯМР ^{13}C порошка дипептида L- α -Ala-DL-Val. Как следует из этого рисунка, так же, как и в случае с дипептидами $\gamma\text{Glu-Trp}$ (гамма глютомат – триптофан) и Glu-Trp (глутомат – триптофан) [12], смена фазового состояния (раствор и твердая фаза) приводит лишь к небольшим изменениям величин химических сдвигов ^{13}C углеродных атомов дипептида L- α -Ala-DL-Val. Отсюда отнесение сигналов, сделанных для углеродных атомов $\text{C}=\text{O}$, C_αH , C_βH и CH_3 дипептида L- α -Ala-DL-Val в растворе, мы можем использовать при отнесении этих сигналов для дипептида L- α -Ala-DL-Val в порошке (поликристалле).

Уменьшение скорости вращения образца приводит к появлению в спектрах CP/MAS ЯМР ^{13}C порошков боковых сигналов от каждого из углеродных атомов вещества. На рис. 7 приведен CP/MAS ЯМР ^{13}C спектр порошка дипептида L- α -Ala-DL-Val, записанного при различных скоростях вращения образца. Из рис. 7 отчетливо видно, что при низких частотах вращения образца появляются боковые полосы сигналов, относящиеся к карбоксильным атомам углеродов дипептида L- α -Ala-DL-Val. При увеличении частоты вращения (14 кГц) эти полосы наблюдаются вне области наблюдения основных сигналов, а интенсивность их очень мала.

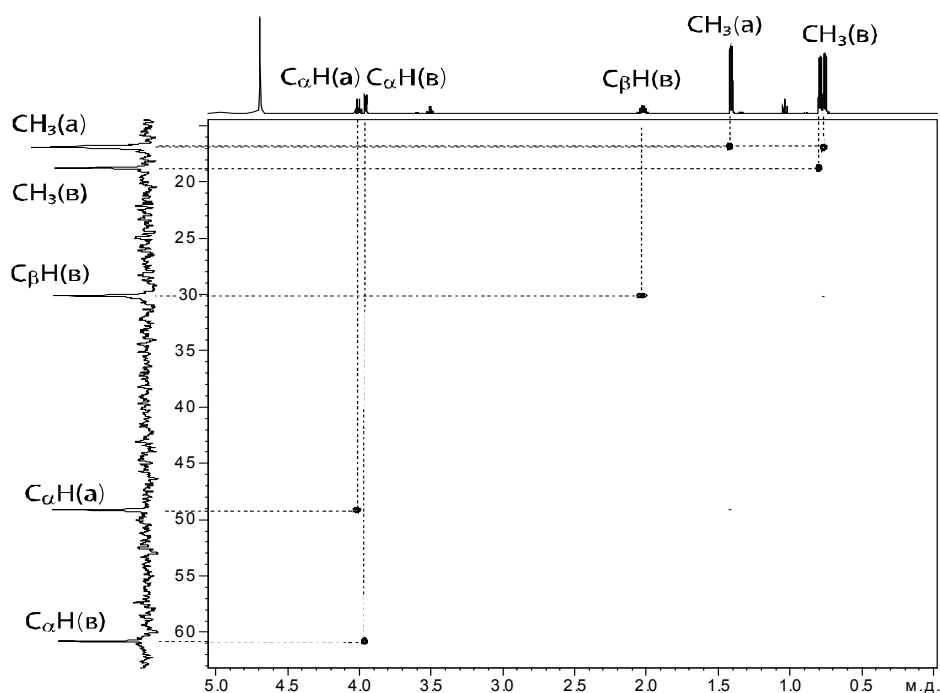


Рис. 5. Двумерный ЯМР ^1H - ^{13}C HSQC спектр дипептида L- α -Ala-DL-Val в растворе D_2O . $T = 298$ К. Сверху расположен спектр ЯМР ^1H , а слева (вертикально) – спектр ЯМР ^{13}C

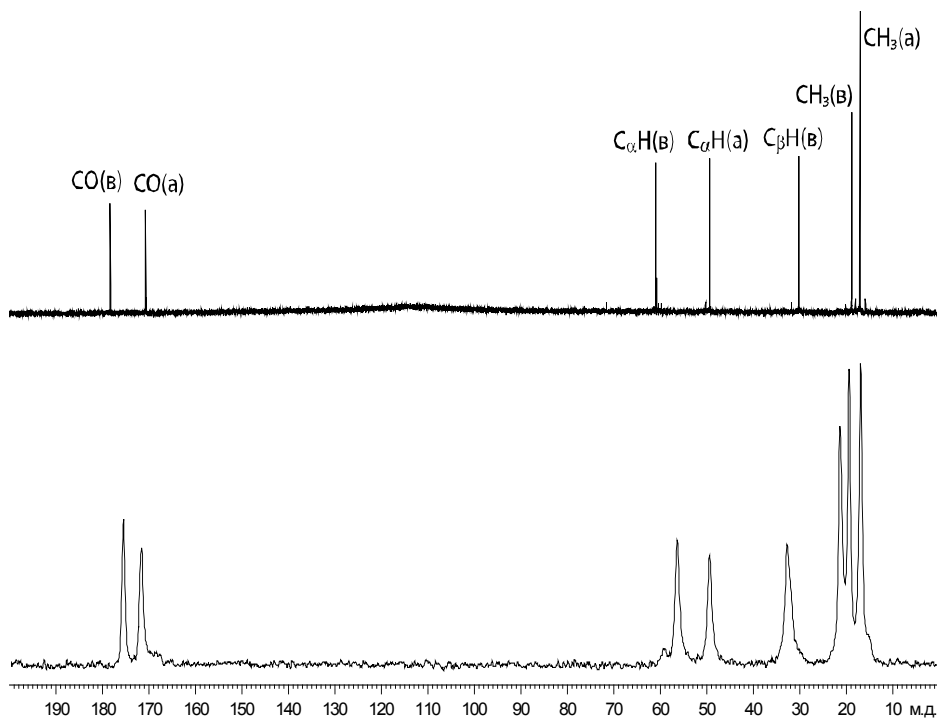


Рис. 6. ЯМР ^{13}C (125.69 МГц, AVANCE-500, «Bruker») спектр дипептида L- α -Ala-DL-Val в растворе D_2O (вверху) и CP/MAS ЯМР ^{13}C (125.69 МГц, AVANCE-500, «Bruker») спектр порошка (внизу) дипептида L- α -Ala-DL-Val (скорость вращения образца – 14 кГц). $T = 298$ К, 0 м.д. соответствует сигналу ЯМР ^{13}C TMS

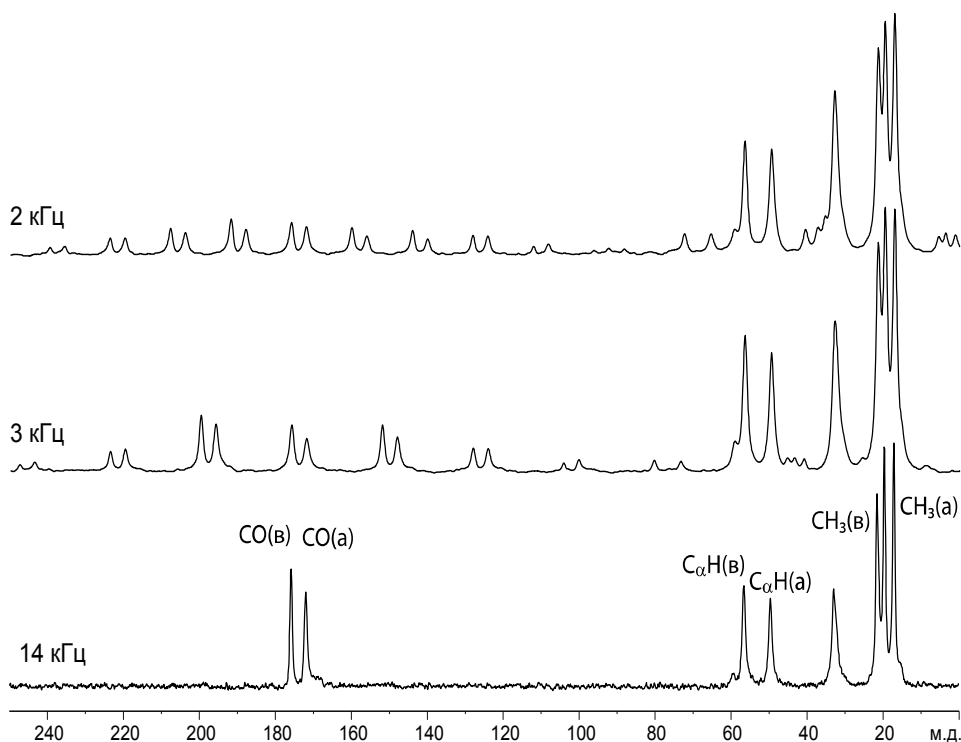


Рис. 7. CP/MAS ЯМР ^{13}C (125.69 МГц, AVANCE-500, «Bruker») спектр порошка дипептида L- α -Ala-DL-Val при различных скоростях вращения образца (сверху вниз скорости вращения образца равны 3, 2 и 14 кГц). $T = 298\text{ K}$, 0 м.д. соответствует сигналу ЯМР ^{13}C TMS

Тензор анизотропии химического сдвига может быть определен из одномерного CP/MAS ЯМР ^{13}C спектра, полученного при медленной скорости вращения образца. Для определения тензора экранирования ядер C=O, входящих в состав дипептида L- α -Ala-DL-Val, были проведены расчеты теоретических CP/MAS ЯМР ^{13}C спектров с помощью программы ADC, входящей в состав программного обеспечения ЯМР-спектрометра «AVANCE-500» фирмы «Bruker». С помощью этой компьютерной программы можно произвести подгонку теоретических сигналов и сигналов, полученных экспериментально, задавая компоненты тензора экранирования. Таким способом были найдены наиболее оптимальные значения компонентов тензора экранирования ядер C=O-групп, входящих в состав дипептида L- α -Ala-DL-Val, при которых сигналы теоретического и экспериментального спектра из интересующей нас области максимально совпадают (рис. 8).

В табл. 1 приведены полученные таким образом значения компонентов тензоров химических сдвигов карбонильных атомов углерода аминокислотных остатков L- α -Ala и DL-Val и изотропное значение химического сдвига CP/MAS ЯМР ^{13}C (δ_{iso}) для C=O.

В работе [13] было проведено подобное CP/MAS ЯМР ^{13}C исследование для группы C=O остатка Ala в различных дипептидах (скорость вращения 1.5 кГц). Результаты представлены в табл. 2. Их анализ показывает, что определенные

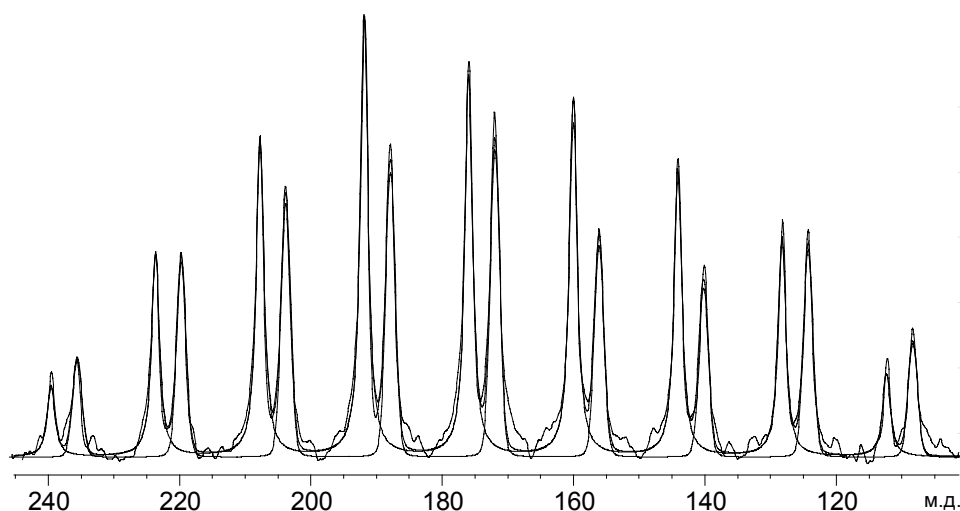


Рис. 8. Рассчитанный и экспериментальный CP/MAS ЯМР ^{13}C (125.69 МГц, AVANCE-500, «Bruker») спектры С=О-групп порошка дипептида L- α -Ala-DL-Val при скорости вращения образца 2 кГц

Табл. 1

Значения компонентов тензоров химических сдвигов (в м.д.) атомов углерода С=О-групп дипептида L- α -Ala-DL-Val и изотропное значение химического сдвига ^{13}C (δ_{iso}) для С=О-групп

Атомы углеродов	Скорость вращения, кГц	δ_{iso}	δ_{11}	δ_{22}	δ_{33}	$\Delta = \delta_{11} - \delta_{33}$
С=О (L- α -Ala)	2	172.04	245.5	179.6	91.01	154.49
	3	171.97	244.51	179.55	91.85	152.66
С=О (DL-Val)	2	175.99	239.84	179.74	108.41	131.43
	3	175.95	240.66	181.6	105.58	135.08

Табл. 2

Значения компонентов тензора химического сдвига (в м.д.) атома углерода С=О-группы Ala в различных дипептидах и изотропное значение химического сдвига ^{13}C (δ_{iso}) для С=О-группы

Дипептид	δ_{iso}	δ_{11}	δ_{22}	δ_{33}	$\Delta = \delta_{11} - \delta_{33}$
Ala-Gly	171.1	248.5 ± 0.8	173.2 ± 0.5	91.6 ± 0.8	156.9 ± 1.1
Ala-Asp	171.7	247.4 ± 2.5	177.5 ± 2.0	90.2 ± 2.5	157.2 ± 3.0
Ala-Ser	170.4	245.5 ± 3.0	170.8 ± 2.5	94.9 ± 3.0	150.6 ± 3.5

нами тензора анизотропии химического сдвига ^{13}C группы С=О остатка Ala в порошкообразном образце дипептида L- α -Ala-DL-Val достаточно близки к литературным данным.

Аналогичным образом были получены значения компонентов тензоров химических сдвигов CP/MAS ЯМР ^{13}C СН- и СН₃-групп аминокислотных остатков L- α -Ala и DL-Val и изотропные значения химических сдвигов CP/MAS ЯМР ^{13}C (δ_{iso}) для этих же групп (табл. 3).

Табл. 3

Значения компонентов тензоров химических сдвигов (в м.д.) атомов углерода СН- и СН₃-групп дипептида L- α -Ala-DL-Val и изотропное значение химических сдвигов ¹³C (δ_{iso}) для СН- и СН₃-групп (скорость вращения 4 кГц)

Атомы углеродов	δ_{iso}	δ_{11}	δ_{22}	δ_{33}	$\Delta = \delta_{11} - \delta_{33}$
C α H (DL-Val)	115.49	162.49	111.96	72.01	90.48
C α H (L- α -Ala)	117.66	158.87	97.24	96.87	62
C β H (DL-Val)	133.43	204.55	105.8	89.95	114.6
CH ₃ (DL-Val)	140.22	166.95	139.96	113.75	53.2
CH ₃ (DL-Val)	139.23	166.25	141.56	109.87	56.38
CH ₃ (L- α -Ala)	134.67	158.72	124.71	120.59	38.13

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 09-03-00077а) и программы РНП Министерства образования РФ.

Summary

I.Z. Rakhmatullin, A.R. Yulmetov, A.V. Aganov, V.V. Klochkov. ¹³C NMR Spectroscopy and Chemical Shift Anisotropy of L- α -Ala-DL-Val in Solid State.

We present here the results of investigation of the spatial structure of L- α -Ala-DL-Val dipeptide in the solid state by the method of ¹³C CP/MAS NMR spectroscopy. The assignment of ¹H and ¹³C NMR signals of L- α -Ala-DL-Val dipeptide in solution (D₂O) was performed using the two-dimensional NMR spectroscopy (COSY and HSQC). ¹³C CP/MAS NMR (125.69 MHz) spectra of the dipeptide are described, and the results of the comparative analysis of ¹³C chemical shift values for α CH and α CH₂ carbon atoms of L- α -Ala-DL-Val dipeptide in solution and in powder are presented. The components of chemical shift anisotropy tensors for carbon atoms in both amino-acid residues (L- α -Ala and DL-Val) are determined for the solid-state dipeptide.

Key words: oligopeptides, ¹H and ¹³C NMR spectroscopy, two-dimensional NMR (COSY and HSQC) spectroscopy and ¹³C CP/MAS NMR spectroscopy, chemical shift, anisotropy, tensor.

Литература

1. *Boman H.G.* Peptide antibiotics and their role in innate immunity // *Annu. Rev. Immunol.* – 1995. – V. 13. – P. 61–92.
2. *Zasloff M.* Antimicrobial peptides of multicellular organisms // *Nature.* – 2002. – V. 415. – P. 389–395.
3. *Wang Z., Wang G.* APD: the antimicrobial peptide database // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – V.32. – P. 590–592.
4. *Epand R.M., Vogel H.J.* Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1999. – V. 1462. – P. 11–28.
5. *Haerberlen U., Mehring M.* High resolution NMR spectroscopy in solids. – Berlin: Springer Verlag, 1976. – 504 p.
6. *Wuthrich K.* NMR of Proteins and Nucleic Acids. – N. Y.: Wiley-VCH, 1986. – 396 p.
7. *Bradley E.K., Kerr J.M., Richter L.S., Figliozzi G.M., Goff D.A., Zuckermann R.N., Spellmeyer D.C., Blaney J.M.* NMR structural characterization of oligo-N-substituted glycine lead compounds from a combinatorial library // *Mol. Divers.* – 1997. – V. 3, No 1. – P. 1–15.

8. *Anishetty S., Pennathur G., Anishetty R.* Tripeptide analysis of protein structures // *BMC Struct. Biol.* – 2002. – V. 2. – P. 1472–1507.
9. *Breitmaier E., Woelker W.* ^{13}C NMR spectroscopy. Methods and application in organic chemistry. – Weinheim, N. Y.: Verlag Chemie, 1978. – 322 p.
10. *Ernst R.R., Bodenhausen B., Wokaun A.* Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions. – Oxford: Oxford Univ. Press, 1987. – 610 p.
11. *Berger S., Braun S.* 200 and More NMR Experiments. – Weinheim: Wiley-VCH, 2004. – 810 p.
12. *Klochkov V.V., Baikov R.F., Skirda V.D., Klochkov A.V., Muhamadiev F.R., Baskyr I., Berger S.* Spatial structure of peptides determined by residual dipolar couplings analysis // *Magn. Reson. Chem.* – 2009. – V. 47. – P. 57–62.
13. *Wei Y., Lee D.-K., Ramamoorthy A.* Solid-State ^{13}C NMR chemical shift anisotropy tensors of polypeptides // *J. Am. Chem. Soc.* – 2001. – V. 123, No 25. – P. 6118–6126.

Поступила в редакцию
25.02.10

Рахматуллин Ильфат Зуфарович – студент физического факультета Казанского (Приволжского) федерального университета.

Юльметов Айдар Рафаилович – кандидат физико-математических наук, ассистент кафедры общей физики Казанского (Приволжского) федерального университета.

Аганов Альберт Вартанович – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой общей физики Казанского (Приволжского) федерального университета.

Клочков Владимир Васильевич – доктор химических наук, профессор кафедры общей физики Казанского (Приволжского) федерального университета.
E-mail: vladimir.klochkov@ksu.ru