

УДК 541.12.038.2:536.75:536.728

ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ОЛИГОПЕПТИДОВ ПО ДАННЫМ CP/MAS ЯМР ^{13}C СПЕКТРОСКОПИИ В ТВЕРДОЙ ФАЗЕ

*А.В. Клочков, А.Р. Юльметов, Р.Ф. Байкиев,
Ф.Р. Мухамадиев, В.В. Клочков*

Аннотация

Установлена конформация основных цепей олигопептидов Glu-Trp, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-His, Gly-Gly-Tyr и nAc-Ser-Phe-Val-Gly-OMe в твердой фазе по CP/MAS ЯМР ^{13}C спектрам этих соединений в порошке. На основе сравнительного анализа величин ЯМР ^{13}C химических сдвигов αCH или αCH_2 углеродных атомов олигопептидов в растворе и порошке определены конформации цепей олигопептидов в твердой фазе.

Ключевые слова: ЯМР, CP/MAS ЯМР ^{13}C , твердое тело, олигопептиды, конформации.

Введение

Известно, что биологическая активность протеинов или белков связана с их пространственным строением. Изучение конформаций олигопептидов, содержащих в цепи от двух и более аминокислотных остатков, также важно, поскольку их можно рассматривать в качестве структурных блоков протеинов, и знание их строения может быть использовано для предсказания конфигурации цепей полипептидов [1, 2].

Ранее [3–6] с использованием подхода, основанного на анализе величин констант остаточного диполь-дипольного взаимодействия [7, 8] между магнитными ядрами ^{13}C и ^1H , разделенными одной химической связью (^1D), определено пространственное строение олигопептидов Glu-Trp, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-His, Gly-Gly-Tyr и nAc-Ser-Phe-Val-Gly-OMe в растворе D_2O (рис. 1). Для всего ряда этих систем получены координаты атомов [3–6], определяющих химический состав олигопептидов, которые, в дальнейшем, могут быть использованы при сравнении с координатами атомов аналогичных аминокислотных последовательностей, входящих в состав полипептидов или белков. Данные о координатах атомов протеинов в подавляющем большинстве случаев определяются методом рентгеноструктурного анализа в твердой фазе. Отсюда задача определения структурных параметров олигопептидов в твердой фазе независимыми методами имеет важное значение. Данная статья посвящена установлению конформаций основных цепей некоторых олигопептидов в твердой фазе методом CP/MAS ЯМР ^{13}C спектроскопии.

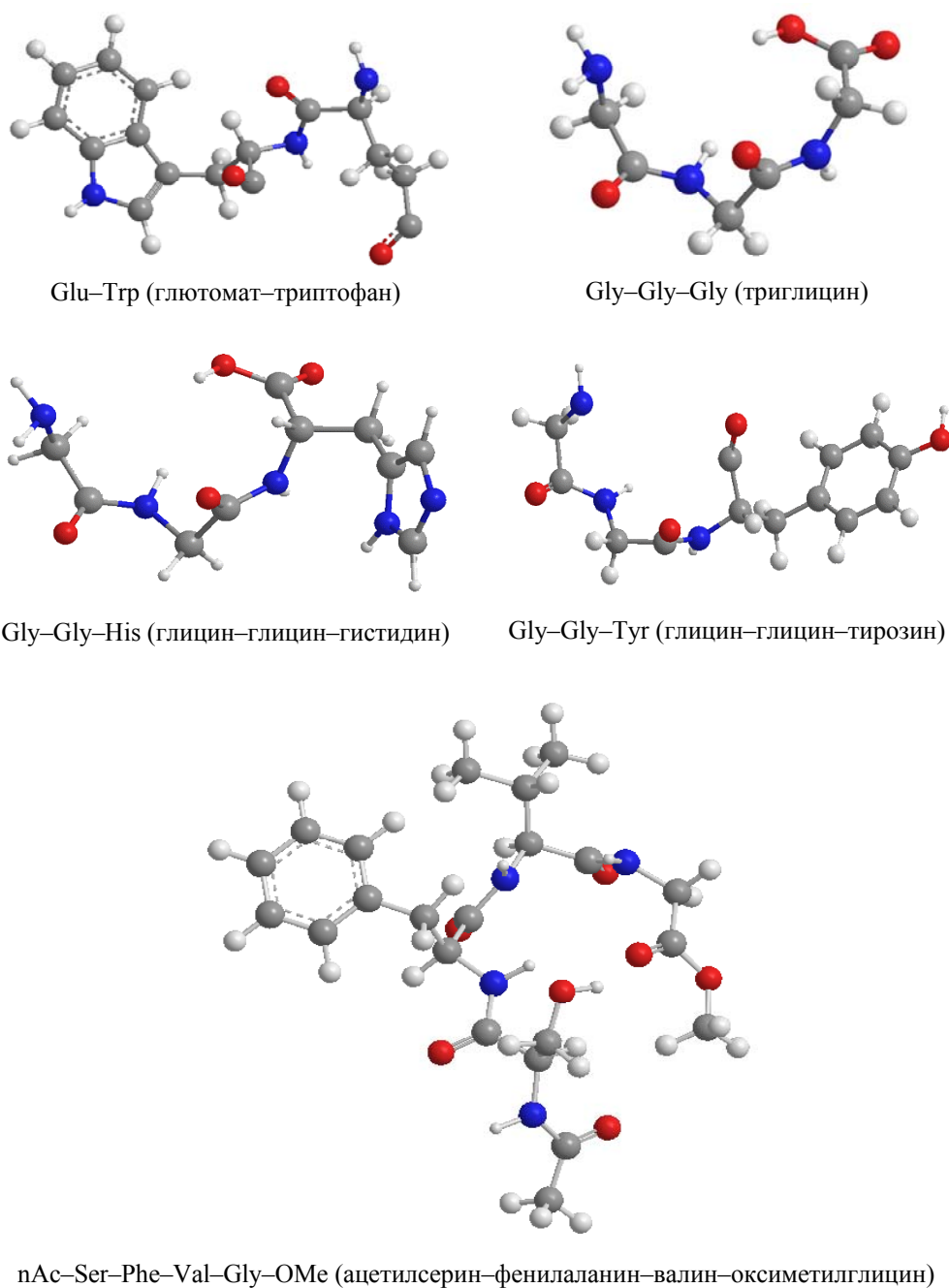


Рис. 1. Конформации олигопептидов Glu-Trp, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-His, Gly-Gly-Tyr и nAc-Ser-Phe-Val-Gly-OMe, для которых наблюдалось лучшее соответствие между наблюдаемыми и рассчитанными значениями остаточных констант диполь-дипольного взаимодействия [3–6]

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР ^{13}C CP/MAS (75.43 МГц) олигопептидов Glu-Trp, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-His, Gly-Gly-Tyr и nAc-Ser-Phe-Val-Gly-OMe в твердом состоянии (порошок) сняты при комнатной температуре на ЯМР-спектрометре "Unity-300" фирмы "Varian" с использованием датчика фирмы "Doty Scientific". Регистрация спектров проводилась при скоростях вращения 4.5 кГц. Число накоплений – от 64. В качестве внешнего стандарта использовался ЯМР-сигнал алмаданта.

Обсуждение результатов

Спектры ЯМР ^{13}C CP/MAS (75.43 МГц) олигопептидов, таких, как дипептид Glu-Trp (глутамат-триптофан); трипептиды Gly-Gly-Gly (триглицин), Gly-Gly-His (глицин-глицин-гистидин), Gly-Gly-Tyr (глицин-глицин-тирозин); тетрапептид nAc-Ser-Phe-Val-Gly-OMe (ацетилсерин-фенилаланин-валин-оксиметилглицин) получены для твердой фазы. Результаты сравнительного анализа величин химических сдвигов ^{13}C αCH или αCH_2 углеродных атомов олигопептидов в растворе и порошке позволили установить их пространственное строение в твердой фазе. С одной стороны, эти соединения могут рассматриваться как модельные, поскольку найденные координаты всех атомов, входящих в их состав, могут быть непосредственно использованы в сравнении с координатами атомов аналогичных аминокислотных последовательностей, входящих в состав полипептидов или белков. С другой стороны, эти олигопептиды представляют самостоятельный интерес. Так, дипептид Glu-Trp является основной составляющей лекарственного средства, повышающего работу иммунной системы пациентов [3]. Трипептиды Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-His и Gly-Gly-Tyr [4, 5] являются лигандами в комплексах с Cu(II), которые используются в качестве моделей активных центров работоспособности ферментов. Тетрапептид nAc-Ser-Phe-Val-Gly-OMe является моделью исследования межмолекулярных взаимодействий с растворителями, поскольку, являясь коротким пептидом, он содержит как ароматическую, так и алифатическую составляющие, а также полярные группы [9].

ЯМР ^{13}C спектр дипептида Glu-Trp (рис. 2) в растворе D_2O описан в работе [3] и состоит из десяти синглетных сигналов (нами рассматривались лишь метиновые и метиленовые атомы углеродов), химические сдвиги которых сведены в табл. 1.

Для установления конформации основной цепи дипептида Glu-Trp в твердой фазе были сняты и проанализированы CP/MAS ЯМР ^{13}C спектры соединений в порошкообразном состоянии. Неизменность величин химических сдвигов ^{13}C олигопептидов в растворе и твердой фазе позволяла бы утверждать о неизменности конформации при переходе из одного фазового состояния в другое, поскольку отличие в конформациях привело бы к существенным различиям в химических сдвигах (от 3 до 7 м. д.) [10, 11].

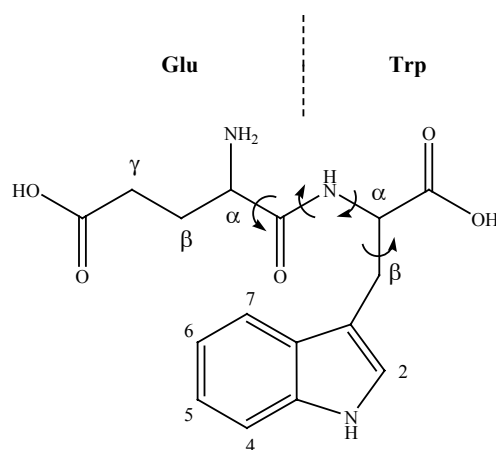


Рис. 2. Структурная формула дипептида Glu–Trp (глутамат–триптофан)

Табл. 1

Химические сдвиги ЯМР ^{13}C атомов углерода (δ_{C} , м. д., относительно ТМС) для дипептида Glu–Trp в изотропном растворителе и твердой фазе

Среда	α CH Glu	β CH ₂ Glu	γ CH ₂ Glu	α CH Trp	β CH ₂ Trp	2-CH Trp	4-CH Trp	5-CH Trp	6-CH Trp	7-CH Trp
D ₂ O	52.35	26.20	30.15	55.45	26.75	124.20	119.40	118.55	121.8	111.60
твердая фаза	47.9	22.6	23.9	54.8	23.9	125.1	118.7	115.3	120.4	111.2

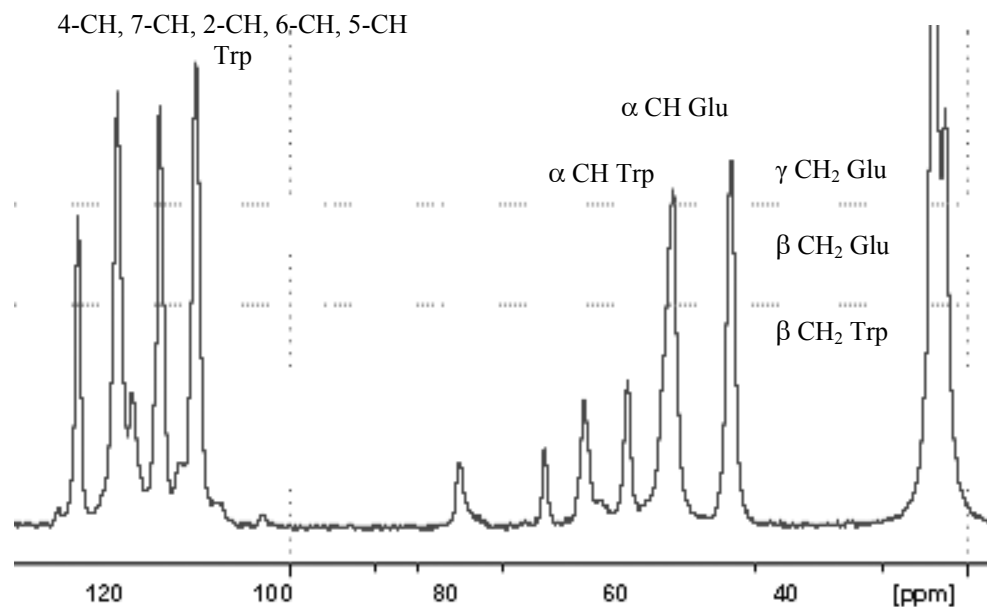


Рис. 3. CP/MAS ЯМР ^{13}C (75.43 МГц) спектр дипептида Glu–Trp. Скорость вращения образца – 4.5 кГц; четыре сигнала с δ_{C} от 58 до 78 м. д. – «боковые вращения» основных сигналов

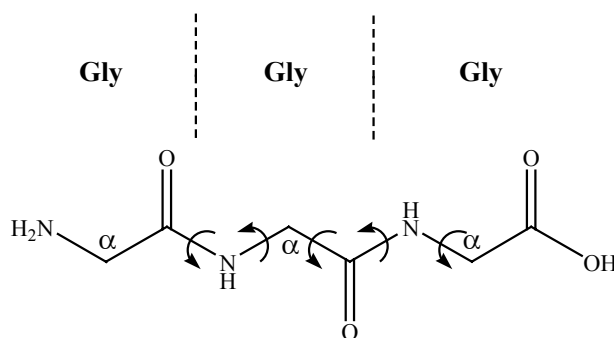


Рис. 4. Структурная формула трипептида Gly–Gly–Gly (триглицин)

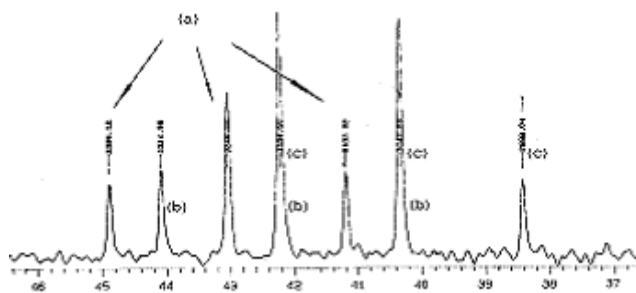
Рис. 5. Фрагмент ЯМР ^{13}C (75.43 МГц) спектра (без развязки от протонов) триглицина в изотропном растворителе (D_2O); сигналы относятся к углеродным CH_2 -группам фрагментов Gly [4]

Табл. 2

ЯМР ^{13}C и CP/MAS ЯМР ^{13}C химические сдвиги атомов углерода (δ_{C} , м. д., относительно TMS) для триглицина в изотропном растворителе и твердой фазе

Среда	1 ас		2 ас		3 ас	
	C=O;	CH ₂	C=O;	CH ₂	C=O;	CH ₂
D_2O	167.7;	41.4	170.8;	42.2	176.4;	42.9
твердая фаза	167.0;	42.5*	171.0;	42.5*	175.0;	42.5*

*Наблюдается один уширенный сигнал с $\delta_{\text{C}} = 42.5$ м. д.

На рис. 3 приведен CP/MAS ЯМР ^{13}C спектр дипептида Glu–Trp, а в табл. 1 – значения химических сдвигов дипептида в твердой фазе. Как следует из данных таблицы, переход от раствора к твердой фазе приводит к существенному изменению значений химических сдвигов атомов углеродов (до 5 м. д.) дипептида Glu–Trp, что не позволяет говорить об идентичности конформеров дипептида в этих фазовых состояниях.

ЯМР ^{13}C спектр триглицина (рис. 4), растворенного в D_2O , состоит из шести синглетных сигналов, снятых в условиях развязки от протонов (рис. 5), химические сдвиги которых сведены в табл. 2. Отнесение сигналов в спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C сделано ранее, в соответствии с литературными данными [4, 10].

С целью установления конформации триглицина в твердой фазе были сняты и проанализированы CP/MAS ЯМР ^{13}C спектры Gly–Gly–Gly в порошкообразном

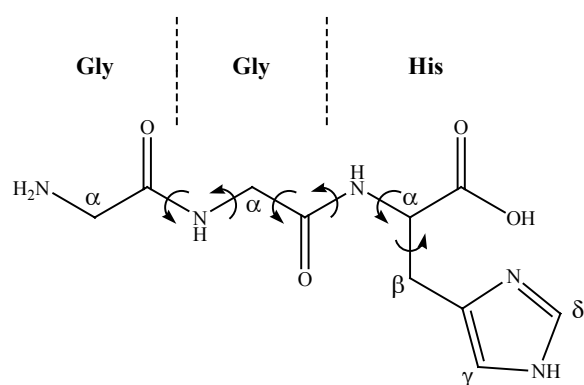


Рис. 6. Структурная формула трипептида Gly–Gly–His (глицин–глицин–гистидин)

Табл. 3

ЯМР ^{13}C и СР/МАС ЯМР ^{13}C химические сдвиги алифатических атомов углерода для Gly–Gly–His в изотропном растворителе и твердой фазе

Среда	αCH_2 Gly 1	αCH_2 Gly 2	αCH His	βCH_2 His	γCH His	δCH His
D ₂ O	40.4	41.5	54.1	27.9	116.7	134.3
твердая фаза	39.4	41.0	55.0	29.0	116.2	136.0

состоянии. Близость величин ЯМР ^{13}C химических сдвигов Gly–Gly–Gly в растворе этим величинам в твердой фазе (табл. 2) позволяет однозначно утверждать о неизменности конформации при смене фазового состояния.

Химические сдвиги алифатических атомов углерода Gly–Gly–His (рис. 6) приведены в табл. 3. Отнесение сигналов в спектрах ЯМР ^{13}C было сделано ранее, также в соответствии с литературными данными [5, 10].

Были сняты и проанализированы СР/МАС ЯМР ^{13}C спектры соединения в порошкообразном состоянии. Хорошее соответствие величин ЯМР ^{13}C химических сдвигов Gly–Gly–His в растворе аналогичным величинам в твердой фазе (табл. 3) позволяет утверждать об идентичности конформаций основной цепи трипептида при переходе из одного фазового состояния в другое.

ЯМР ^{13}C химические сдвиги алифатических атомов углерода Gly–Gly–Tyr (рис. 7) приведены в табл. 4. Отнесение сигналов в спектрах ЯМР ^{13}C также сделано ранее в соответствии с литературными данными [5, 10].

Близость величин ЯМР ^{13}C химических сдвигов Gly–Gly–Tyr в растворе и твердой фазе (СР/МАС ЯМР ^{13}C , табл. 4) позволяет утверждать о неизменности конформации глицин–глицин–тирозина при переходе из одного фазового состояния в другое.

ЯМР ^{13}C спектр тетрапептида nAc–Ser–Phe–Val–Gly–Ome (рис. 8), растворенного в D₂O, состоит из десяти синглетных сигналов (рассматривались лишь метиновые и метиленовые атомы углеродов), химические сдвиги которых сведены в табл. 5. Отнесение сигналов в ЯМР ^{13}C спектрах тетрапептида было сделано на основании использования двумерной ЯМР-спектроскопии (COSY и HSQC модификации) [6, 12].

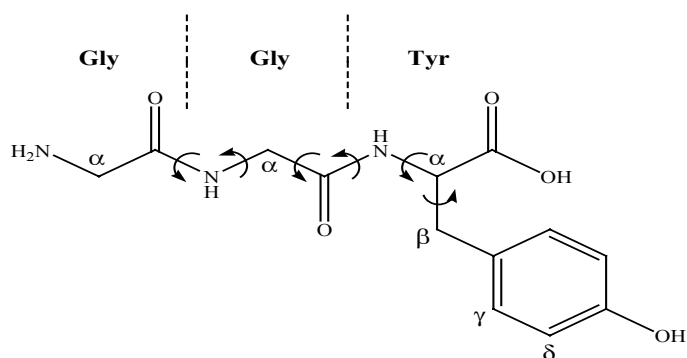


Рис. 7. Структурная формула трипептида Gly–Gly–Тур (глицин–глицин–тирозин)

Табл. 4

ЯМР ^{13}C и CP/MAS ЯМР ^{13}C химические сдвиги алифатических атомов углерода (δ_{C} , м. д. относительно ТМС) для Gly–Gly–Тур, растворенного в изотропном растворителе и твердой фазе

Среда	αCH_2 Gly 1	αCH_2 Gly 2	αCH Tyr	βCH_2 Tyr	γCH Tyr	δCH Tyr
D ₂ O	40.4	42.2	56.4	36.7	115.2	130.6
твердая фаза	40.7	43.1	57.7	36.6	115.3	129.0

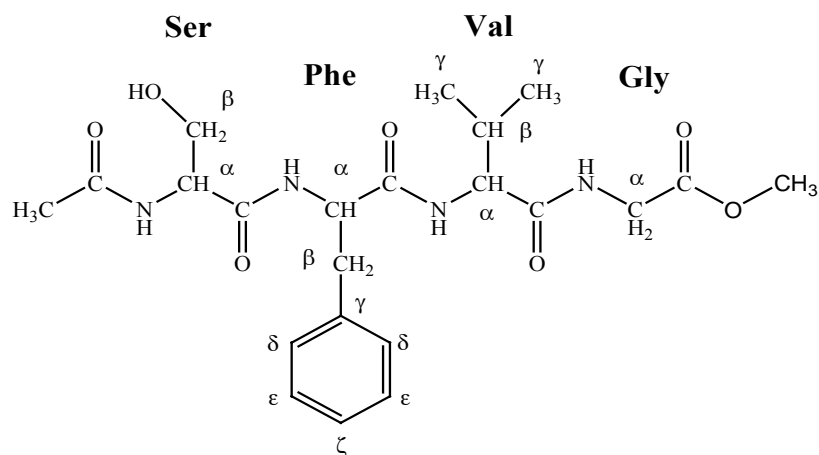


Рис. 8. Структурная формула тетрапептида nAc–Ser–Phe–Val–Gly–Оме (ацетилсерин-фенилаланин–валин–оксиметилглицин)

Табл. 5

ЯМР ^{13}C и CP/MAS ЯМР ^{13}C химические сдвиги алифатических атомов углерода (δ_{C} , м. д. относительно ТМС) для тетрапептида nAc–Ser–Phe–Val–Gly–ОМе, растворенного в изотропном растворителе и твердой фазе

Среда	α CH Ser	β CH ₂ Ser	α CH Phe	β CH ₂ Phe	2,6-CH Phe	3,5-CH Phe	4-CH Phe	α CH Val	β CH Val	α CH ₂ Gly
D ₂ O	54.3	59.9	55.1	36.9	128.6	129.0	127.0	59.1	30.1	40.9
твердая фаза	55.0	60.0	55.0	36.9	126.9; 126.3	131.0	124.4	59.4	29.8	40.8

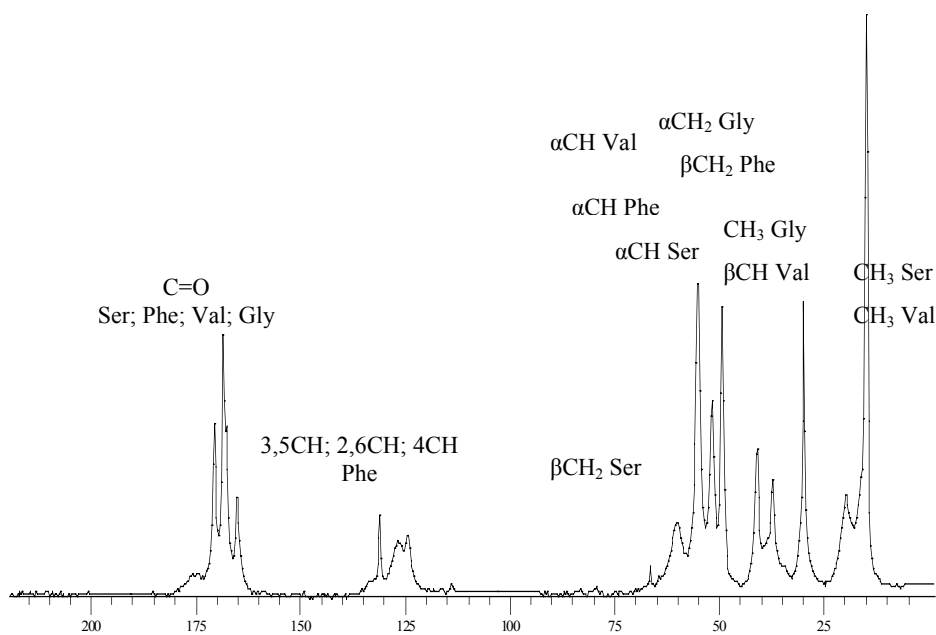


Рис. 9. CP/MAS ЯМР ^{13}C (75.43 МГц) спектр тетрапептида nAc-Ser-Phe-Val-Gly-OMe. Скорость вращения образца – 4.5 кГц

Пространственное строение тетрапептида nAc-Ser-Phe-Val-Gly-OMe в твердой фазе устанавливали по CP/MAS ЯМР ^{13}C спектрам соединения в порошкообразном состоянии. На рис. 9 приведен CP/MAS ЯМР ^{13}C спектр nAc-Ser-Phe-Val-Gly-OMe, а в табл. 5 – значения химических сдвигов тетрапептида в твердой фазе. Неизменность величин ЯМР ^{13}C химических сдвигов тетрапептида в растворе и твердой фазе также позволяет утверждать о неизменности конформации основной цепи nAc-Ser-Phe-Val-Gly-OMe при переходе из одного фазового состояния в другое.

Таким образом, в четырех из пяти случаев изменение фазового состояния (раствор и твердая фаза) не привело к существенным изменениям величин ЯМР ^{13}C химических сдвигов αCH или αCH_2 углеродных атомов исследованных олигопептидов. Очевидно, что в случае твердой фазы к внутримолекулярным механизмам, определяющим значения химических сдвигов, должны добавляться и межмолекулярные (эффекты упаковки, относительная ориентация молекул в узлах решетки молекулярного кристалла и т. п.). Тем не менее, как следует из эксперимента, существенных изменений химических сдвигов в рамках каждого из соединений не наблюдалось. Все это позволяет говорить о неизменности конформаций основных цепей олигопептидов при переходе из одного фазового состояния в другое и использовать координаты атомов, определяющих химический состав олигопептидов, найденные с использованием подхода, который основан на анализе величин констант остаточного диполь-дипольного взаимодействия в твердой фазе.

Работа выполнена при поддержке РФФИ и программы РНП Высшей школы Министерства образования РФ.

Summary

A.V. Klochkov, A.R. Yulmetov, R.F. Baikeev, F.R. Muhamadiev, V.V. Klochkov. A Spatial Structure of the Some Oligopeptides in Solid State Determined by CP/MAS NMR ^{13}C Spectroscopy.

Conformation of main oligopeptide chains, such as Glu-Trp, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-His, Gly-Gly-Tyr and nAc-Ser-Phe-Val-Gly-Ome, was determined in solid state by CP/MAS NMR ^{13}C spectra of these compounds in powder. Comparative analysis of NMR ^{13}C chemical shift values for αCH or αCH_2 carbons of the oligopeptides in solution and in powder allowed determining the oligopeptide chain conformations in solid state.

Key words: NMR, CP/MAS NMR ^{13}C , solid state, oligopeptides, conformations.

Литература

1. 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 // *Molecular Diversity*. – 1997. – V. 3. – P. 1–15.
2. Anishetty S., Pennathur G., Anishetty R. Tripeptide analysis of protein structures // *BMC Struct. Biol.* – 2002. – V. 2. – P. 1472–1507.
3. Klochkov V.V., Baikeev 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, No 1. – P. 57–62.
4. Klochkov V.V., Khairutdinov B.I., Klochkov A.V., Shtyrilin V.G., Shaykhutdinov R.A. A spatial structure of triglycine determined by the residual dipolar couplings analysis // *Appl. Magn. Reson.* – 2003. – V. 25, No 1. – P. 113–119.
5. Клочков А.В., Шамсутдинов М.Н., Валеев Б.К., Юльметов А.Р., Зявкина Ю.И., Штырлин В.Г., Клочков Ал.В., Скирда В.Д., Клочков В.В. Пространственное строение некоторых трипептидов в лиотропных средах, растворах и твердой фазе по данным ЯМР спектроскопии // XIII Всерос. конф. «Структура и динамика молекулярных систем»: Сб. ст. – Казань – Москва – Йошкар-Ола – Уфа, 2006. – Ч. 1. – С. 406–410.
6. Клочков В.В., Скирда В.Д., Клочков А.В., Бергер С. Пространственное строение тетрапептида NAc-Ser-Phe-Val-Gly-OMe определенное путем анализа констант остаточного диполь-дипольного взаимодействия // *Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки.* – 2007. – Т. 149, кн. 1. – С. 21–30.
7. Tjandra N., Bax A. Direct Measurement of distances and angles in biomolecules by NMR in a dilute liquid crystalline medium // *Science*. – 1997. – V. 278. – P. 1111–1114.
8. Alba E., Tjandra N. NMR dipolar couplings for the structure determination of biopolymers in solution // *Progress in NMR Spectroscopy*. – 2002. – V. 40. – P. 175–197.
9. Diaz M.D., Berger S. Preferential Solvation of a Tetrapeptide by Trifluoroethanol as Studied by Intermolecular NOE // *Magn. Reson. Chem.* – 2001. – V. 39, No 7. – P. 369–373.
10. Breitmaier E., Woelter W. ^{13}C NMR spectroscopy. Methods and application in organic chemistry. – Weinheim, New York.: Verlag Chemie, 1978. – 322 p.
11. Wuthrich K. NMR of Proteins and Nucleic Acids. – N. Y.: Wiley-VCH, 1986. – 396 p.
12. Berger S., Braun S. 200 and More NMR Experiments. – Weinheim: Wiley-VCH, 2004. – 853 p.

Поступила в редакцию
13.11.08

Клочков Антон Владимирович – аспирант кафедры молекулярной физики Казанского государственного университета.

Юльметов Айдар Рафаилович – кандидат физико-математических наук, инженер кафедры общей физики Казанского государственного университета.

Байкиев Рустем Фрунзевич – доктор медицинских наук, профессор кафедры биохимии Казанского государственного медицинского университета.

Мухамадиев Фархат Рифатович – лаборант кафедры биохимии Казанского государственного медицинского университета

Клочков Владимир Васильевич – доктор химических наук, профессор кафедры общей физики Казанского государственного университета.

E-mail: vladimir.klochkov@ksu.ru