

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФИЗИКИ

КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ ФИЗИКИ

Направление: 03.04.02 Физика
Профиль: Медицинская Физика

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИКЛИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ CSL И DEV-025
МЕТОДАМИ ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА И
МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ


Студент 2 курса группы 06-019
«15» июня 2022 г.

 (Архангельский П.В.)

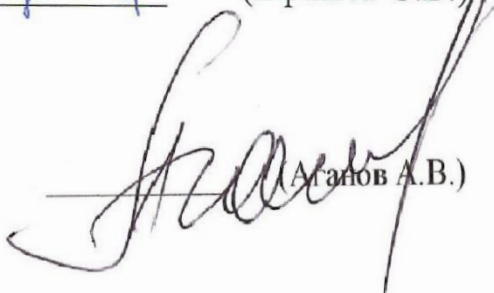
Научный руководитель
д.х.н., профессор
«15» июня 2022 г.

 (Ключков В.В.)

Научный консультант (*при наличии*)
к.ф.-м.н., с.м.с.
«15» июня 2022 г.

 (Ефимов С.В.)

Заведующий кафедрой
д.х.н., профессор
«15» июня 2022 г.

 (Аганов А.В.)

Казань-2022

Содержание

Введение	3
1 Многомерная спектроскопия	6
1.1 Явление ядерного магнитного резонанса	7
1.2 Элементы многомерных ЯМР-экспериментов.....	9
1.3 Элементы двумерного ЯМР-эксперимента	10
1.4 Генерация многомерных спектров ЯМР	11
2 Гомоядерная ЯМР спектроскопия	14
2.1 COSY эксперимент.....	14
2.1 TOCSY эксперимент	17
2.2 Ядерная спектроскопия с эффектом Оверхаузера (NOESY)	20
3 Гетероядерная ЯМР спектроскопия	24
3.1 HSQC эксперимент.....	24
3.1 Гетероядерная корреляционная спектроскопия через несколько связей (HMBC)	26
4 Принципы молекулярного моделирования	28
4.1 конформационный анализ методами молекулярной механики.....	30
4.2 Метод отжига	32
5 Объекты исследования.....	34
6 Результаты экспериментов	36
Заключение	41
Список литературы.....	42

Введение

В последнее время, наряду с малыми молекулами и макромолекулами, циклопептиды получили широкое применение в разработке лекарств. Интерес к ним вызван их особыми функциональными и структурными свойствами. Также, циклические пептиды являются перспективными для разработки нового класса лекарств ввиду их способности связываться с широким спектром молекул-мишеней и ингибировать их [1].

Циклические пептиды представляют собой группу природных соединений, как правило, построенных из протеиногенных α -аминокислот по тому же принципу, что и линейные полипептиды, т.е. обладающих специфичными амидными (пептидными) связями. Отклонением от белкового подобия можно считать включение в эти цепочки, замкнутые в макроциклы, α -аминокислот D-конфигурации и модифицированных L- α -аминокислот. В основном, их источниками являются грибы и различные микроорганизмы. Циклические пептиды весьма разнообразны по биологической активности — это антибиотики, токсины и регуляторы транспорта ионов. При этом их биологические свойства, в какой-то мере, связаны с размером цикла. В зависимости от величины циклопептидов (другими словами, от количества аминокислотных остатков, их составляющих), мы и проанализируем этот класс соединений [2].

В работе исследуются пептиды, получаемые из почвенных грибов. Интерес к циклопептидам обусловлен их обширным биологическим действием, такими, как противомикробная, инсектицидная, цитотоксическая, противораковая активность [3]. Поэтому они имеют большой потенциал в качестве лекарственных препаратов. Есть предположения, что ключевым свойством циклических пептидов является баланс между мембранной проницаемостью и растворимостью, так как их конформационная гибкость

зависит от растворителя [4].

Циклоспорины – это циклопептиды, состоящие из 11 аминокислот, продуцируются грибами, паразитами насекомых; среди этих пептидов были обнаружены соединения, которые используются при лечении аутоиммунных заболеваний и после трансплантации органов [5, 6]. Циклоспорины вырабатываются различными грибами, в том числе *Trichoderma*, *Tolyposcladium*, *Fusarium* и др [7]. Обычно эти пептиды обладают иммуносупрессивной и противогрибковой активностью [8, 9, 10, 11, 12]. Одним из наиболее известных циклопептидов является циклоспорин А (CsA). Он широко используется в медицине в качестве иммунодепрессанта, используется при трансплантации органов и хорошо изучен [13, 14].

Объектом исследования являются циклические пептиды алиспоривир (DEV-02) и циклоспорин L (CsL).

Для анализа методами молекулярного моделирования конформационный поиск является полезным способом для обнаружения минимумов потенциальной энергии гибкой молекулы. Особенно он важен для молекул с большим числом структур, находящихся в подвижном равновесии, из-за большого количества степеней свободы. В таких случаях используют метод молекулярной динамики. Важным шагом в исследовании трехмерной структуры белков является определение того, как отдельные боковые цепи взаимодействуют друг с другом и с основной цепью, а также определение роли, которую они играют в образовании и стабилизации вторичной и третичной структуры. Конформация основной цепи определяется способностью к образованию водородных связей и наличием L- и D- изомеров у всех аминокислотных остатков, кроме глицина [15, 16].

В работе производится конформационный анализ CsL и Debio025 в хлороформе на основе данных спектроскопии ядерного магнитного резонанса высокого разрешения и молекулярного моделирования.

Целью работы являлось исследование структуры представленных пептидов методами спектроскопии ЯМР и молекулярного моделирования.

Исходя из указанной цели, в работе были поставлены следующие задачи:

1. На основе сравнительного анализа одномерных и двумерных спектров COSY, TOCSY, ROESY, и HSQC осуществить полное соотнесение сигналов ЯМР ^1H и ^{13}C .
2. Проинтегрировать сигналы на спектрах ROESY при разных временах смешивания.
3. Составить таблицу, содержащую список ядер, соответствующих кросс-пикам ROESY, их интегральные интенсивности и соответствующие межатомные расстояния
4. С помощью молекулярного моделирования получить ансамбль трехмерных структур циклоспорина и алиспоривира.
5. Оценить межатомные расстояния и двугранные углы в изучаемой молекуле по данным молекулярного моделирования, выбрать наилучшие структуры.

1 Многомерная спектроскопия

Многомерные эксперименты ЯМР генерируют спектр, в котором положение спектральной линии или пика определяется двумя и более частотами. Наличие такого пика указывает на то, что участвующие спины связаны друг с другом косвенным спин-спиновым (скалярным) взаимодействием через химические связи или через диполь-дипольное взаимодействие через пространство. Положение пика определяется химическими сдвигами или резонансными частотами связанных спинов.

Все протоны в аминокислотном остатке принадлежат одной и той же сети скалярно связанных спинов, или спиновой системе. Исключением из этого правила являются ароматические остатки, в которых ароматические протоны образуют отдельную спин-систему из-за исчезающе слабого взаимодействия между протоном $H\beta$ и протонами ароматического кольца. Спины, принадлежащие спиновой системе, можно идентифицировать с помощью многомерной J-коррелированной спектроскопии. Идентификация типа остатка на основе свойств спиновой системы, таких как количество и тип химических сдвигов, является важным шагом в отнесении резонансных линий к отдельным атомам в белке [17].

1.1 Явление ядерного магнитного резонанса

Многомерные эксперименты ЯМР состоят из чередующейся последовательности периодов «мечения» химического сдвига и периодов переноса намагниченности, или смешивания. Периоды смешивания служат для передачи информации о химическом сдвиге от одного спина к его связанному партнеру. Например, в двумерном (2D) ЯМР-эксперименте, представленном: $A \rightarrow B$, намагничивание начинается со спина «А», это частота, обозначенная химическим сдвигом «А», и затем она передается в течение периода смешивания спину «В». Намагниченность на спине «В» определяется как сигнал в приемной катушке. Окончательный обнаруженный сигнал теперь зависит от двух временных областей: первая используется для записи ω_A , а вторая временная область используется для измерения ω_B . Обнаруженный сигнал в конце двумерного эксперимента $S(t_1, t_2, t_3)$ имеет вид:

$$S(t_1, t_2, t_3) = \eta e^{i(\omega_A t_1)} e^{i(\omega_B t_2)}, \quad (1)$$

где η представляет собой эффективность передачи намагниченности между двумя спинами. Итоговый сигнал, показанный в формуле (1) указывает, что непосредственно обнаруженный ССИ $e^{i(\omega_B t_2)}$ модулируется членом, $e^{i(\omega_A t_1)}$, который содержит информацию о частоте связанного спина. Преобразование Фурье этого сигнала даст двумерный спектр, который содержит единственный пик, расположенный в (ω_a, ω_b) . Этот тип пика называется кросс-пиком, потому что две частоты, определяющие его положение, различны. В некоторых экспериментах, особенно в многомерных экспериментах с гомоядерными протонами, существуют пики, которые имеют одинаковую частоту во всех измерениях. Эти пики называются собственными или диагональными пиками и представляют намагниченность, которая не была передана другому спину во время эксперимента, следовательно, зарегистрированные частоты одинаковы во всех измерениях.

В трехмерном эксперименте используются два сегмента маркировки и смешивания, в результате чего путь потока намагниченности между тремя спинами выглядит следующим образом: $A \rightarrow B \rightarrow C$.

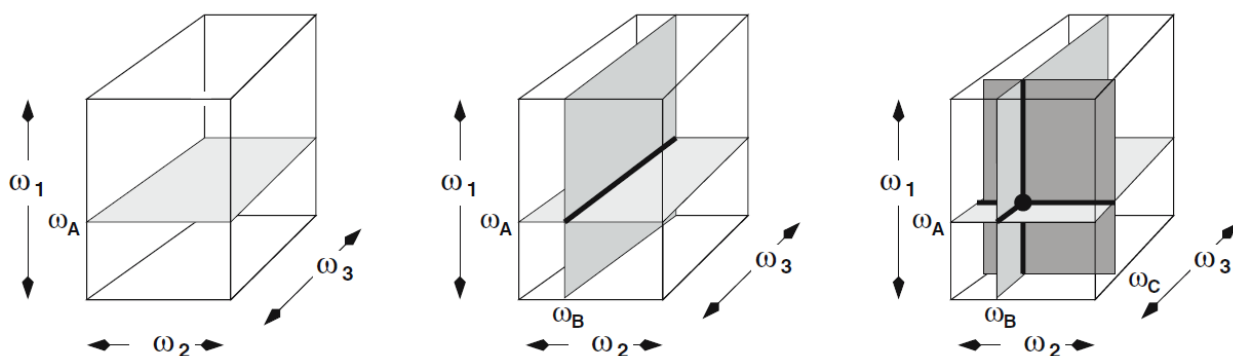


Рисунок 1 – Расположение пика в трехмерном спектре

Расположение кросс-пика в трехмерном спектре определяется пересечением трех ортогональных плоскостей. Первая плоскость – это геометрическое место всех точек, которые имеют частоту ω_A в первом частотном измерении. Вторая плоскость – это геометрическое место всех точек, имеющих частоту ω_B во втором частотном измерении. Пересечение этих двух плоскостей представляет собой линию, как показано на центральной диаграмме. Третья плоскость определяется всеми точками, которые имеют частоту ω_C в третьем частотном измерении. Эта плоскость пересекает линию в единственной точке, которая является местоположением перекрестной вершины.

$$S(t_1, t_2, t_3) = \eta e^{i(\omega_A t_1)} e^{i(\omega_B t_2)} e^{i(\omega_C t_3)}. \quad (2)$$

В этом случае амплитуда обнаруженного ССИ модулируется членами, которые предоставляют информацию о частотах двух других связанных спинов. Преобразование Фурье этого сигнала приведет к возникновению пика, положение которого в трехмерном кубе определяется значениями ω_A , ω_B и ω_C в каждом измерении, как показано на рис. 1.

В многомерных экспериментах интенсивность кросс-пиков будет пропорциональной η .

В случае J-связанных спинов η может приближаться к единице. В случае дипольно-связанных спинов η зависит от расстояния между двумя спинами, обеспечивая средство измерения межатомных расстояний [17].

1.2 Элементы многомерных ЯМР-экспериментов

Обобщенные импульсные последовательности для двумерных и трехмерных экспериментов показаны на рисунке 2. Любой двумерный ЯМР-эксперимент можно разделить на четыре основных элемента: подготовка, эволюция, смешивание и обнаружение. В трехмерном эксперименте период эволюции и период перемешивания будут повторяться еще раз.

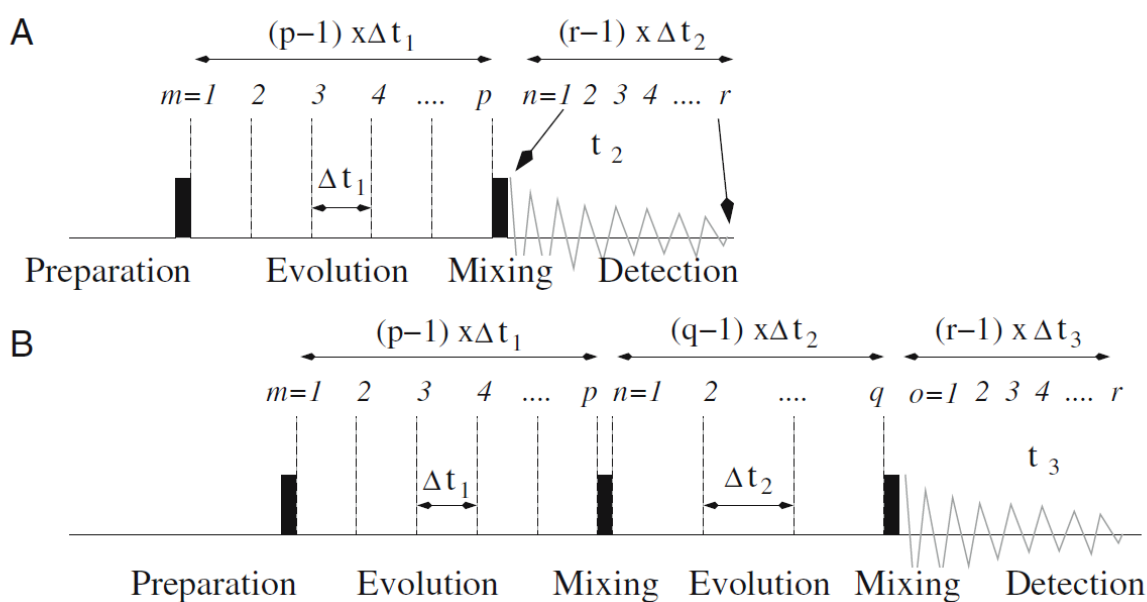


Рисунок 2 – Обобщенные двумерные и трехмерные импульсные последовательности

Графики А и В показывают двумерный и трехмерный эксперимент соответственно. Оба эксперимента начинаются с импульса возбуждения, за

которым следует период эволюции t_1 , а затем период смешивания. В двумерном эксперименте ССИ собирают после периода перемешивания. В случае трехмерного эксперимента перед детектированием сигнала ССИ следует еще один период эволюции и перемешивания. Первоначально длина периода t_1 устанавливается равной нулю (или $\Delta t_1/2$), и собирается первый ($m = 1$) ССИ, содержащий r точек. Обратите внимание, что этот β сигнал ССИ обычно состоит из нескольких сканирований, которые суммируются в одной и той же области памяти. Затем t_1 увеличивается на фиксированную величину Δt_1 (время выдержки в t_1), и второй ($m = 2$) ССИ собирается и сохраняется в другой ячейке памяти. Этот процесс повторяется в общей сложности p раз, пока не будет достигнуто желаемое время эволюции. В случае трехмерного эксперимента (В) периоды эволюции t_1 и t_2 выбираются независимо. Для каждого времени t_1 будет получено q времени t_2 , что приведет к получению в общей сложности $p \times q$ отдельных ССИ. Обратите внимание, что приращение t_1 (Δt_1) не обязательно равно приращению t_2 (Δt_2), и p не обязательно равно q .

1.3 Элементы двумерного ЯМР-эксперимента

Подготовительный период: Продолжительность этого периода является фиксированной и обычно используется для того, чтобы позволить спинам вернуться к термодинамическому равновесию или приблизиться к нему. Этот период обычно заканчивается одним импульсом под углом 90° , который возбуждает первый спин ($'A'$).

Период эволюции (t_1): этот период времени используется для кодирования химического сдвига $'A'$ в матрице плотности из-за эволюции под действием гамильтониана $H = \omega_A I_{AZ}$. Этот период называется областью, определяемой косвенно, поскольку возбужденное состояние спина $'A'$ не обнаруживается непосредственно приемной катушкой. Скорее, эволюция системы дискретизируется в цифровом виде, т.е. t_1 начинается с нуля, а

затем увеличивается на постоянную величину Δt_1 с отдельным ССИ, полученным при каждом приращении t_1 . Всего было получено p ССИ, что дает общее время сбора данных в t_1 из $(p - 1) \times \Delta t_1$.

Период смешивания: это событие заставляет намагниченность, которая связана со спином 'А', становиться связанной со спином 'В'. Этот период приводит к передаче информации о химическом сдвиге от спина 'А' к спину 'В'. Смешивание может быть вызвано либо косвенным диполь-дипольным взаимодействием, либо дипольной связью. Ключевым моментом является то, что величина намагниченности, передаваемая от А к В, пропорциональна $\cos(\omega_A t_1)$ или $\sin(\omega_A t_1)$. Следовательно, намагниченность 'В' становится амплитудно-модулированной функцией, которая содержит информацию о ω_A .

Период обнаружения: в течение этого периода прямого обнаружения намагниченность, прецессирующая в плоскости x-y, обнаруживается обычным образом. Этот сигнал также цифровая выборка с интервалом времени Δt_2 , обычное время задержки, что дает общее время сбора данных

$(r - 1) \times \Delta t_2$ [17].

1.4 Генерация многомерных спектров ЯМР

Данные двумерного эксперимента ЯМР представляют в виде двумерного массива отдельных точек данных, каждая ячейка которого проиндексирована временем эволюции в t_1 или t_2 , как показано на рисунке 3. В таком случае каждый непосредственно обнаруженный ССИ будет содержать от 1 до 2 тыс. Точек (например, $r = 1024$ или 2048), в то время как косвенно обнаруженный размер будет содержать от 128 до 1 тыс. Точек (например, $p =$ от 128 до 1024), в зависимости от характера эксперимента. . Обработка этих данных временной области в двумерный спектр требует вычисления двумерного преобразования Фурье:

$$\Omega(\omega_1, \omega_2) = \int \int S(t_1, t_2) e^{i\omega_1 t_1} e^{i\omega_2 t_2} dt_1 dt_2, \quad (3)$$

где Ω представляет собой окончательный спектр, а $S(t_1, t_2)$ представляет собой исходную матрицу точек данных.

На практике это преобразование вычисляется по одному измерению за раз, обычно начиная с преобразования данных функции от t_2 , за которым следует преобразование функции от t_1 .

		$t_2 \longrightarrow$									
$t_1 \downarrow$	1	2	3	4	5	6	7	8	.	r	
1	X	X	X	X	X	X	X	X	.	.	
2	X	X	X	X	X	X	X	X	.	.	
3	X	X	X	X	X	X	X	X	.	.	
4	X	X	X	X	X	X	X	X	.	.	
5	X	X	X	X	X	X	X	X	.	.	
.	
p	

Рисунок 3 – Структура данных для двумерного набора данных

К

Каждая строка соответствует ССИ из r точек, который был получен при указанном значении t_1 . Существует в общей сложности p значений t_1 . Каждый ССИ может быть результатом суммы более чем одного сканирования, но все сканирования будут получены с одинаковым значением t_1 .

$$F(t_1, \omega_2) = \int S(t_1, t_2) e^{i\omega_2 t_2} dt_2 \quad (4)$$

$$\Omega(\omega_1, \omega_2) = \int F(t_1, \omega_2) e^{i\omega_1 t_1} dt_1. \quad (5)$$

Как показано на рисунке 3, программное обеспечение обработки будет считывать и преобразовывать p строк, соответствующих непосредственно обнаруженным ССИ, для получения $F(t_1, \omega_2)$ – матрицы смешанных данных. Затем программа загрузит r столбцов и выполнит преобразование Фурье по

переменной t_1 , чтобы сгенерировать окончательную матрицу данных (спектр) $\Omega(\omega_1, \omega_1)$. В случае трехмерного эксперимента эти шаги будут выполняться сначала по переменной t_3 , затем t_2 , а затем t_1 .

2 Гомоядерная ЯМР спектроскопия

2.1 COSY эксперимент

Программа импульсов и последовательность для COSY эксперимента показаны на рисунке 4. COSY эксперимент – самый простой из всех многомерных экспериментов ЯМР, состоящий из импульса возбуждения, периода частотного мечения и второго импульса, служащего для передачи намагниченности от одного связанного спина к другому.

Импульсная программа выполнит n сканирований за первый момент времени t_1 . Каждое из этих сканирований суммируется перед сохранением сигнала ССИ в памяти. Задержка t_1 увеличивается на Δt_1 ($id0$), а затем в новое время t_1 выполняется n сканирований. Этот процесс повторяется

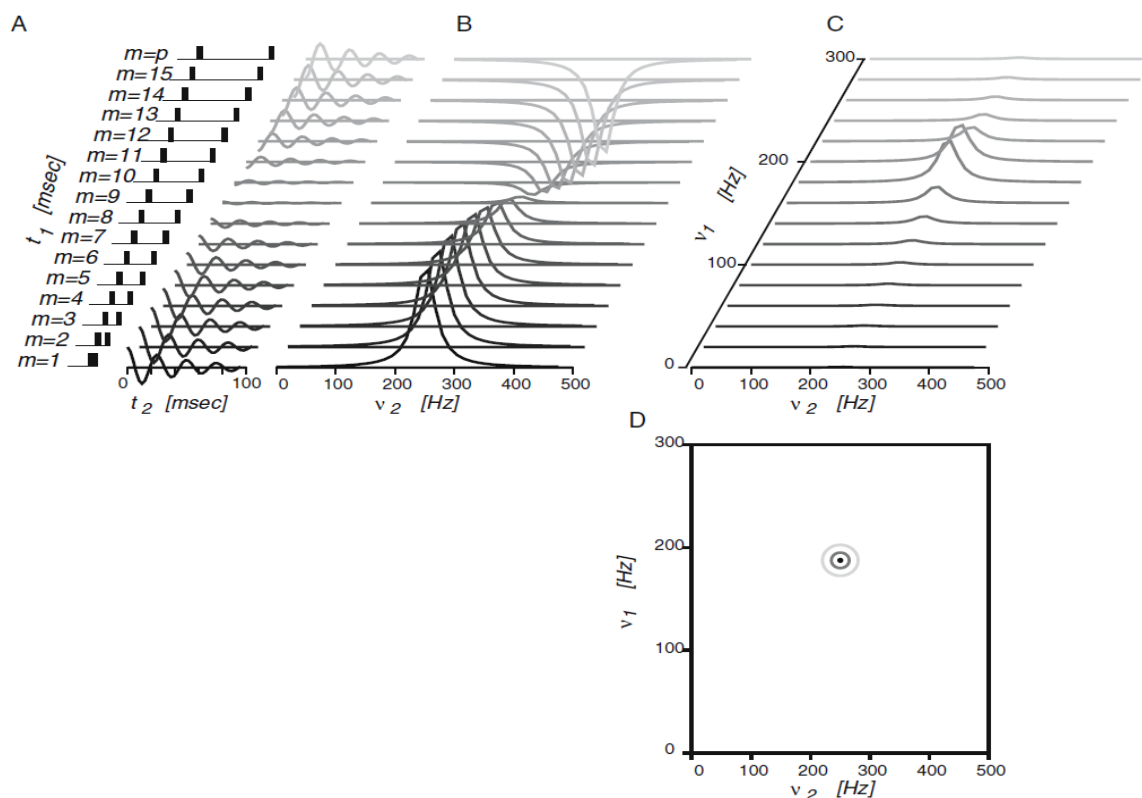


Рисунок 4 – Генерация двумерного спектра

В этом примере частота двух связанных спинов составляет 190 и 250 Гц. Здесь рассматривается только один путь намагничивания (т.е. $A \rightarrow B$),

поэтому в спектре присутствует только один пик, расположенный при $\nu_A = 190$ Гц и $\nu_B = 250$ Гц

COSY используется для определения атомов, соединенных друг с другом. Его импульсная программа состоит из единичного радиочастотного импульса (p_1), за которым следует определенное эволюционное время (t_1), за которым в свою очередь следует второй импульс (p_2), за которым следует время измерения (t_2) [17].

Двумерный спектр, получаемый в эксперименте COSY, показывает частоты одного и того же изотопа, как правило водорода (^1H) по обеим осям. (Техника эксперимента была также усовершенствована для генерирования гетероядерного корреляционного спектра, в котором обе оси соответствуют разным изотопам, например, ^{13}C и ^1H). Спектры COSY показывают два вида пиков:

1. Диагональные пики имеют одинаковую частотную координату на каждой оси и выстраиваются по диагонали спектра;
2. Кросс-пики имеют разное значение для каждой частотной координаты и находятся вне диагональной линии.

Диагональные пики соответствуют пикам в экспериментах одномерной ЯМР (1D-NMR), в то время как кросс-пики показывают связывание между парой атомных ядер (более, чем мультиплетное разделение показывает связывание в 1D-NMR).

Кросс-пики возникают в результате феномена, который называется «перенос намагниченности», и их присутствие обозначает, что два атомных ядра связаны и имеют два разных значения химического сдвига, которые и дают координаты кросс-пика. Каждое связывание дает два симметричных кросс-пика над и под диагональю. Таким образом, кросс-пик возникает, когда существует корреляция между сигналами спектра для каждой из двух осей в данных значениях. Поэтому можно определить, какие атомы соединены друг с другом (в диапазоне небольшого

является эксперимент COSY-45. В COSY-45 45-градусный импульс используется вместо 90° для первого импульса $p1$. Преимущество метода COSY-45 в том, что диагональные пики менее выделяются, таким образом легче соотносить кросс-пики около диагонали в случае анализа крупных молекул. Кроме того, относительные знаки константы связывания могут быть получены в эксперименте COSY-45. Это невозможно в COSY-90. В общем, COSY-45 дает более чистый спектр, в то время как метод COSY-90 более чувствительный.

Другой вид COSY – двухквантовый фильтрованный COSY (Double quantum filtered (DQF COSY)). DQF COSY использует способ выбора когерентности, такой как вращение (циклизация) фазы или градиент импульсного поля, которые инициируют единственные сигналы из двухквантовой когерентности, чтобы дать обозримые сигналы. Это имеет эффект уменьшения интенсивности диагональных 2D пиков и изменения их кривой: от широкой «рассеивания» до четкой «поглощения». Это также убирает диагональные пики несвязанных атомных ядер. Все это имеет преимущество – получается чистый спектр, на котором диагональные пики не будут заслоняться кросс-пиками, которые на обычном COSY спектре более бледные [19].

2.2 Эксперимент TOCSY

Двумерный гомоядерный эксперимент TOCSY (Total correlation spectroscopy) спиновая корреляция со всеми протонами спиновой системы, является инструментом 2D для разделения спиновых систем в том случае, когда в спектре содержится множество перекрывающихся линий. На рисунке 6 представлена импульсная последовательность данного эксперимента.

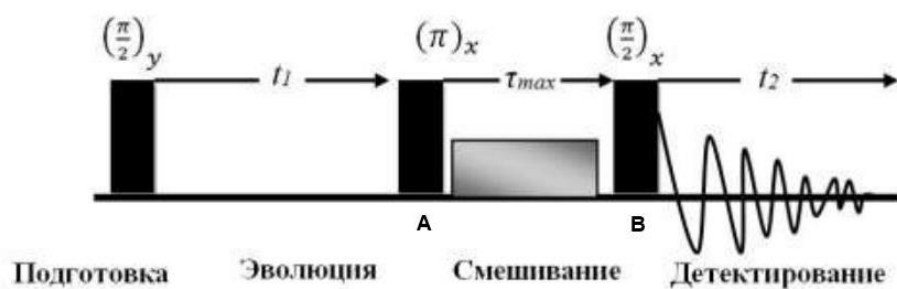


Рисунок 6 – Импульсная последовательность для двумерного TOCSY эксперимента.

Последовательность состоит из четырех этапов, характерных для всех двумерных экспериментов: подготовка, эволюция, смешивание, детектирование [20]. После подготовки β подается 90° -импульс, возбуждающий спины, они свободно прецессируют в течение заданного времени t_1 . За это время кодируются химические сдвиги спина А (иными словами, рассматриваемое состояние спина А становится функцией его резонансной частоты ω_A). Далее идет основная часть эксперимента – период изотропного смешивания, реализованный в виде длинной череды импульсов. Полученные данные записываются в конце эксперимента (детектирование или время прямой эволюции). В этот момент намагниченность кодируется химическим сдвигом спина В.

Спектр TOCSY представляет собой систему-кросс пиков, отвечающих корреляциям всех протонов спиновой системы, как если бы все эти ядра испытывали КССВ друг с другом (и описывались так называемым «гамильтонианом изотропного смешивания»). Таким образом, появляются сигналы от ядер, которые связаны вицинальными 3J взаимодействиями или связаны через цепочку попарно взаимодействующих ядер. К примеру, если спин H_α взаимодействует со спином H_β , а H_β взаимодействует со спином H_γ , то на спектре TOCSY появится кросс-пик от взаимодействия между H_α и H_γ , хотя они

напрямую не связаны. На рисунке 5 представлены для сравнения схематические спектры TOCSY и COSY, в котором появляются сигналы от протонов, связанных геминальными или вицинальными связями, то есть сигналы только от соседних ядер. Так в характерной картине сигналов выделяются спиновые системы, по которым можно идентифицировать конкретную аминокислоту [21].

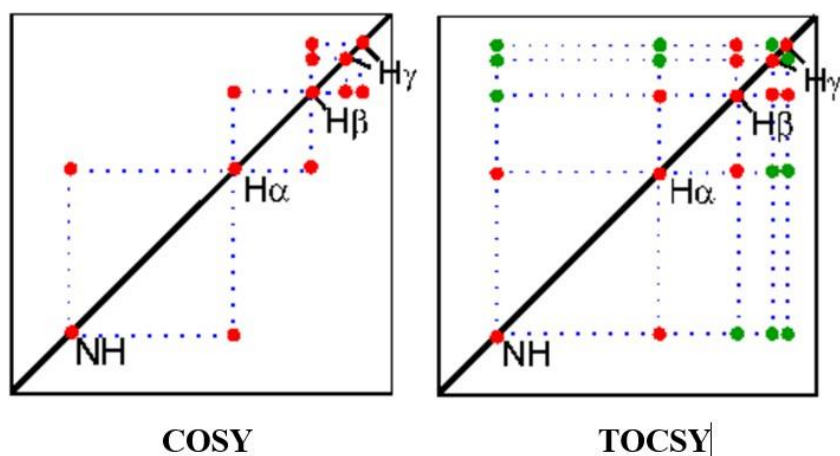


Рисунок 7 – Сравнение спектров экспериментов COSY и TOCSY

2.3 Ядерная спектроскопия с эффектом Оверхаузера (NOESY)

Эксперимент NOESY (Nuclear Overhauser Effect) позволяет получать структурную информацию о молекуле независимо от наличия скалярного спин-спинового взаимодействия между ядрами. В основе метода лежит прямое магнитное взаимодействие ядер (косвенное диполь-дипольное взаимодействие), обычно не оказывающее никакого влияния на внешний вид спектра в жидкой фазе. ЯЭО дает косвенный путь получения информации об этом диполь-дипольном взаимодействии, которое в свою очередь зависит от межъядерных расстояний и движения атомов в молекуле. Отсутствие других удобных способов измерения таких параметров молекул в растворе делает ЯЭО чрезвычайно важным инструментом.

ЯЭО представляет собой изменение интенсивности одного сигнала ЯМР при возбуждении другого. Под словом «возбуждение» подразумевается насыщение перехода, т.е. устранение разности заселенностей его уровней при облучении слабым радиочастотным полем, одновременно с наблюдением других сигналов. Таким образом, ЯЭО – это результат попыток системы в целом удержаться в состоянии теплового равновесия. Мы принудительно изменяем разность заселенностей одной части системы, и другие ее части пытаются скомпенсировать внесенное возбуждение [22].

При попытке выяснения природы ЯЭО и возможностей его применения для получения структурной информации возникают несколько проблем. ЯЭО связан с релаксационными процессами. Он проявляется в изменении интенсивности одного резонансного сигнала при облучении каким-либо способом другого. Для полного понимания этого явления нужно проанализировать возможные пути релаксации многоспиновой системы, выявить механизм их действия и рассчитать относительные вклады различных путей в общую скорость релаксации.

В большинстве реальных экспериментов проводить количественный анализ не имеет смысла, поскольку лучший способ решения структурных задач для молекул разумной сложности это чисто качественное сравнение различных ЯЭО [18].

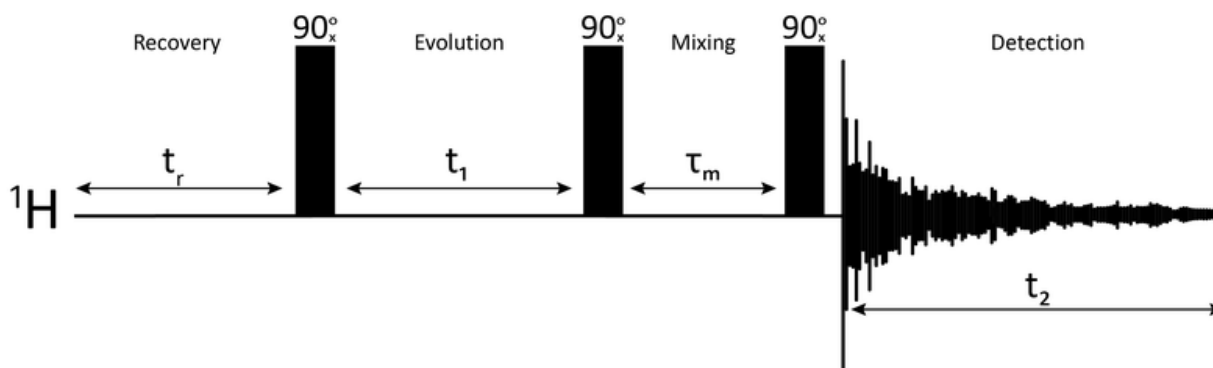


Рисунок 8 – Последовательность импульсов для стандартного двумерного эксперимента NOESY

Базовая последовательность NOESY состоит из трех импульсов под углом 90° . Первый импульс создает поперечную спиновую намагниченность. Спины прецессируют в течение времени эволюции t_1 , которое увеличивается в ходе двумерного эксперимента. Второй импульс создает продольную намагниченность, равную поперечной составляющей намагниченности, ортогональной направлению импульса. Таким образом, идея состоит в том, чтобы создать начальное условие для периода смешивания τ_m . Во время смешивания NOE может происходить перенос намагниченности посредством кросс-релаксации. Для основного эксперимента NOESY τ_m поддерживается постоянным на протяжении всего 2D-эксперимента, но выбирается для оптимальной скорости кросс-релаксации и нарастания ЯЭО (NOE). Третий импульс создает поперечную намагниченность из оставшейся продольной намагниченности. Сбор данных начинается сразу после третьего импульса, и поперечная намагниченность наблюдается как функция времени задержки t_2 импульса. Спектр NOESY генерируется посредством двумерного преобразования Фурье по t_1 и t_2 . Проводят серию экспериментов с увеличением времени

перемешивания, и отслеживают увеличение NOE. Самые близкие протоны показывают самые быстрые темпы нарастания NOE. Соотнесённые сигналы NOESY спектра CsL представлены на рисунке 9.

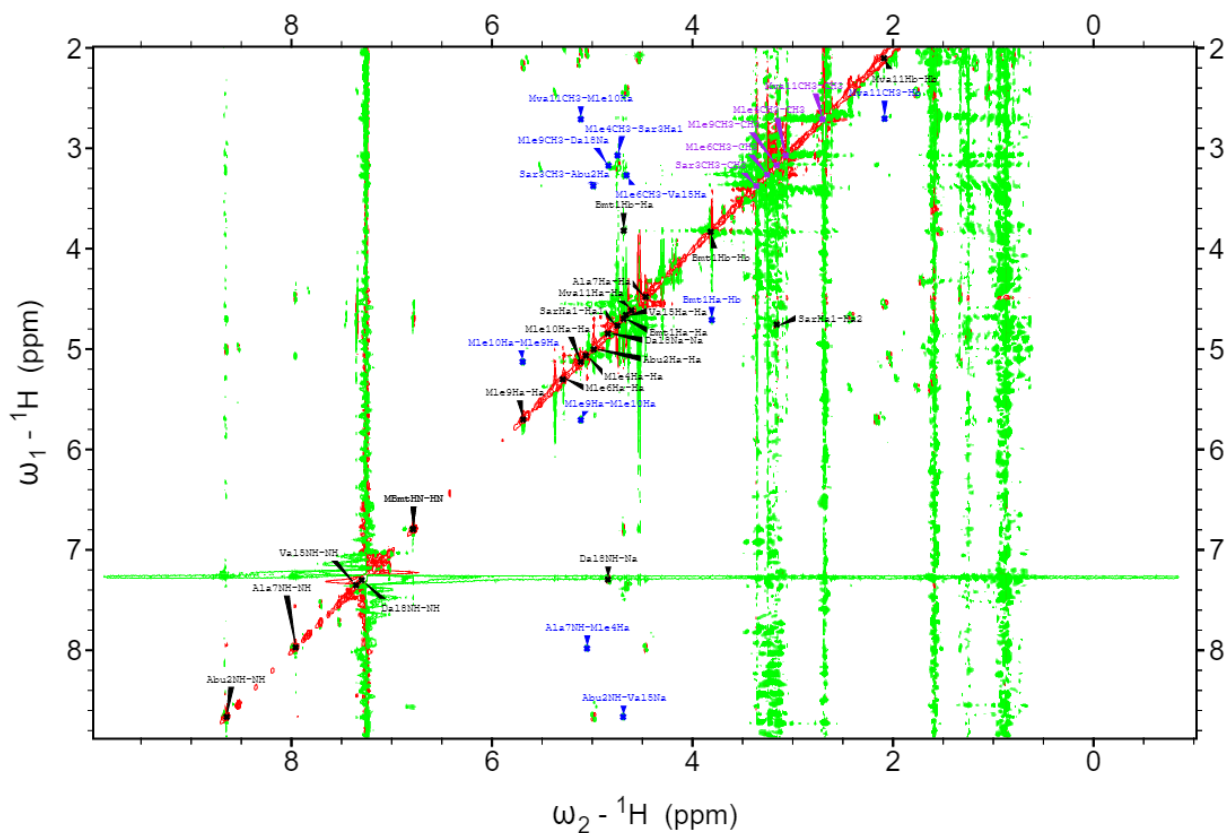


Рисунок 9 – NOESY спектр, синим показаны сигналы обменных кросс-пиков, фиолетовым сигналы протонов NCH₃ групп, сигналы амидных протонов и αгрупп – чёрным

Межпротонные расстояния могут быть определены из однозначно заданных, хорошо разрешенных спектров NOESY с высоким отношением сигнал-шум путем анализа интенсивностей кросс-пиков. Их можно получить путем интегрирования сигналов и преобразовать в оценки межпротонных расстояний.

Соотношение скоростей накопления σ_1/σ_2 связано с протон-протонными расстояниями d_1/d_2 в соответствующих парах как $d_1/d_2 = (\sigma_2/\sigma_1)^{1/6}$ [23]. Посредством данного соотношения интенсивности сигналов были переведены в межатомные расстояния, представленные в таблице 1.

Таблица 1 – Отобранные пары атомов в алиспоривире и циклоспорине L и расстояния между ними (по данным анализа спектров ROESY при температуре 298 К)

Cyclosporin L		Debio025	
Соотнесение	Расстояние (Å)	Соотнесение	Расстояние (Å)
Val5NH-Ha	2,74	Val5NH-Ha	3,10
Ala7NH-Ha	2,77	Ala7NH-Ha	2,77
DAla8NH-Ha	2,51	DAla8NH-Ha	2,82
Abu2NH-Val5Ha	2,15	Abu2NH-MBmt1Ha	2,39
Ala7NH-Mle4Ha	2,21	Ala7NH-Mle6Ha	2,27
Val5Ha-Mle6NCH ₃	2,44	Val5Ha-Mle6NCH ₃	2,38

Эксперимент ROESY похож на NOESY, за исключением того, что начальное состояние другое. Вместо того, чтобы наблюдать кросс-релаксацию из начального состояния z-намагниченности, равновесная намагниченность поворачивается на ось x, а затем блокируется внешним магнитным полем, так что она не может прецессировать. Этот метод полезен для определенных молекул, время вращательной корреляции которых попадает в диапазон, в котором ядерный эффект Оверхаузера слишком слаб, чтобы его можно было обнаружить в эксперименте NOESY. Обычно это молекулы с молекулярной массой около 1000 дальтон. ROESY имеет другую зависимость между временем корреляции и скоростью кросс-релаксации. В NOESY константа скорости кросс-релаксации изменяется с положительной на отрицательную по мере увеличения времени корреляции, давая диапазон, в котором она близка к нулю, тогда как в ROESY константа скорости кросс-релаксации всегда положительна. ROESY иногда называют «перекрестной релаксацией, подходящей для малых молекул, имитирующих заблокированные спины».

3 Гетероядерная ЯМР спектроскопия

3.1 HSQC эксперимент

HSQC определяет корреляции между атомными ядрами двух разных типов, которые разделены одной связью. Этот метод дает один пик для пары связанных ядер, чьи две координаты – это химические сдвиги двух связанных атомов.

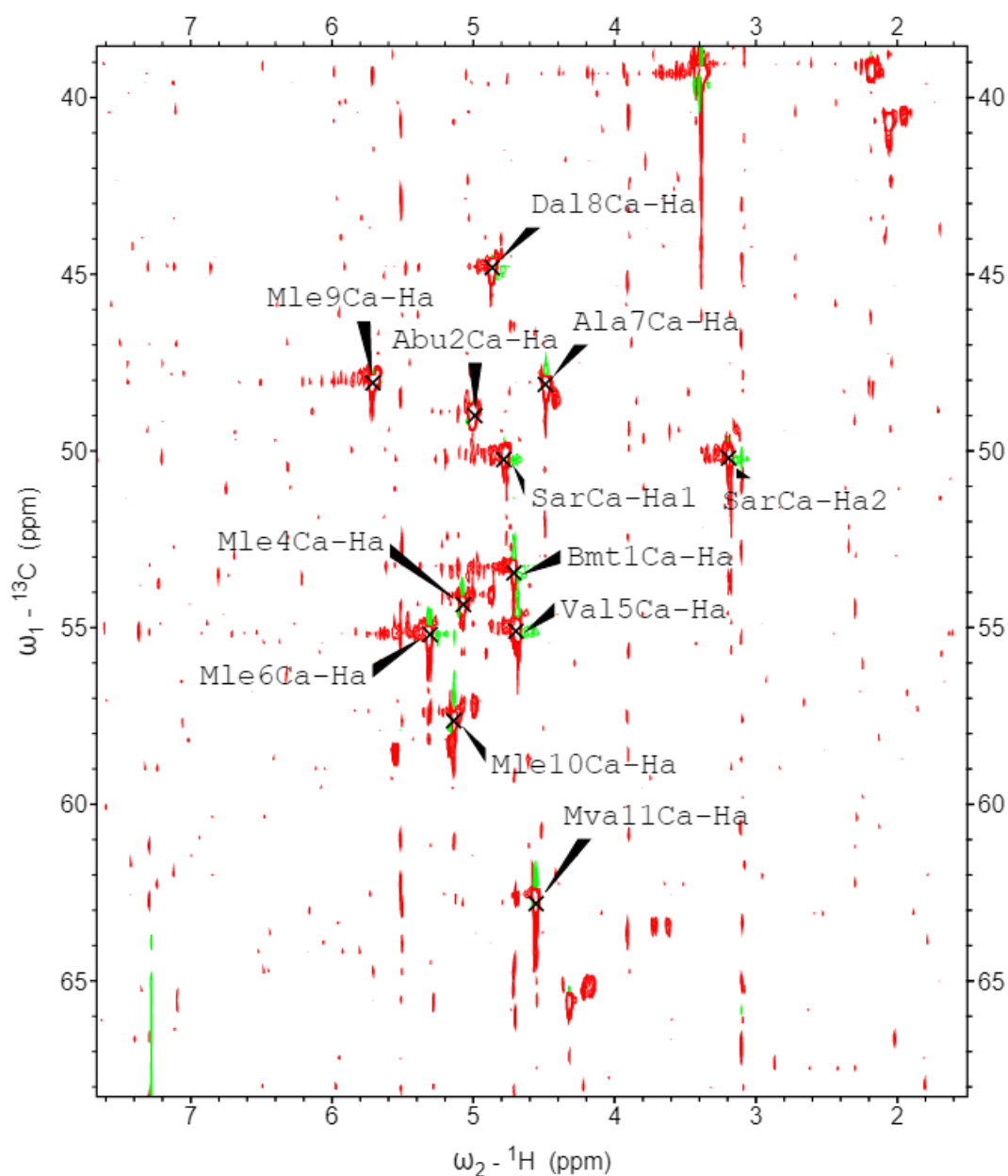


Рисунок 10– Участок спектра HSQC с кросс-пиками протонов α групп

HSQC работает путем передачи намагниченности от ядра I (обычно протона) к ядру S (обычно гетероядру) с использованием последовательности импульсов INEPT; этот первый шаг выполняется, потому что протон имеет большую равновесную намагниченность и, таким образом, этот шаг создает более сильный сигнал. Затем намагниченность эволюционирует и передается обратно ядру I. Нежелательные несвязанные сигналы удаляются путем двойного проведения эксперимента с обращением фазы одного конкретного импульса; это меняет знаки желаемых, но не нежелательных пиков, поэтому вычитание двух спектров даст только желаемые пики. Гетероядерная многоквантовая корреляционная спектроскопия (HMQC) дает спектр, идентичный HSQC, но с использованием другого метода. Оба метода дают одинаковые качественные результаты для молекул малого и среднего размера, но HSQC считается лучшим для более крупных молекул.

В эксперименте HSQC матрица плотности в течение периода эволюции t_1 представлена спиновым оператором $2I_zS_x$. Слагаемое $2I_zS_x$ представляет собой однократно возбужденное состояние, отсюда и название этой последовательности.

Последовательность импульсов HSQC представлена на рисунке 11. Эту последовательность можно разделить на пять сегментов.

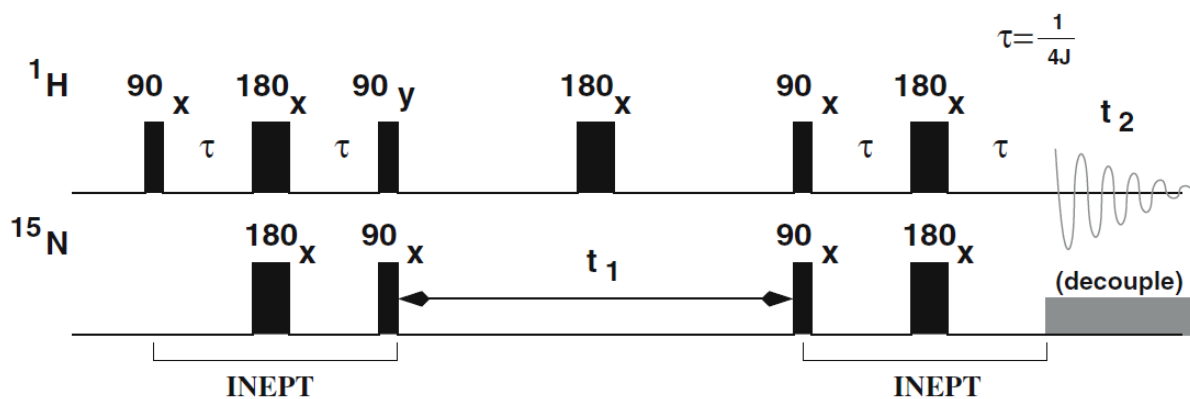


Рисунок 11 – Последовательность импульсов HSQC

Верхний набор импульсов применяется к протонам, а нижний набор импульсов применяется к гетероядерным спином (^{15}N на этом рисунке) через отдельный радиочастотный канал. Узкие полосы соответствуют импульсам 90° , а более широкие полосы соответствуют импульсам 180° . Задержка τ номинально установлена на $\frac{1}{4J}$. Периоды передачи поляризации (INEPT) обозначены и включают одновременный импульс поворота намагниченности протонов и азота на угол 90° .

Повышение чувствительности ядер за счет передачи поляризации (INEPT) – это метод повышения разрешения сигнала, используемый в ЯМР-спектроскопии. Он включает в себя передачу поляризации ядерных спинов от спинов с большой больцмановской разностью населенностей к интересующим ядерным спином с малой разностью населенностей. INEPT использует косвенное спин-спиновое взаимодействие (J-связь) для передачи поляризации, в отличие от ядерного эффекта Оверхаузера (NOE), который возникает в результате дипольной кросс-релаксации. Из-за его полезности для усиления сигнала импульсные последовательности, используемые в экспериментах с гетероядерным ЯМР, часто содержат блоки INEPT или INEPT-подобных последовательностей [17].

3.2 Гетероядерная корреляционная спектроскопия через несколько связей (HMBC)

HMBC обнаруживает гетероядерные корреляции в более длинных диапазонах, от 2 до 4 связей. В частности, этот эксперимент нужен для нахождения протонов метильных групп при атомах азота (NCH_3) по известным сигналам углеродов. Также в нём появляются пики, показывающие взаимодействие между ядром α углерода и соседними ядрами водорода, отделёнными от него 2-3 связями (β , γ).

Сложность обнаружения корреляций через несколько связей состоит в том, что последовательности HSQC и HMQC содержат определенное

время задержки между импульсами, которое позволяет обнаруживать только диапазон вокруг определенной константы связи. Это не проблема для методов одинарной связи, поскольку величины КССВ (J) лежат в узком диапазоне, но дальние константы КССВ охватывают гораздо более широкий диапазон и не могут быть все уловлены в одном эксперименте HSQC или HMQC.

В HMBC эта трудность преодолевается за счет исключения одной из этих задержек в последовательности HMQC. Это увеличивает диапазон констант связи, которые могут быть обнаружены, а также снижает потери сигнала при релаксации. Цена состоит в том, что это исключает возможность разделения спектра и вносит фазовые искажения в сигнал. Существует модификация метода HMBC, который подавляет сигналы с одной связью, оставляя только сигналы с несколькими связями [18, 19].

4 Основные принципы молекулярного моделирования

В процессе оптимизации моделируется структура молекулы, данный метод заключается в нахождении состояния с минимальной энергией, различной для каждой молекулы. Для этого определяют низкоэнергетические состояния молекулярной системы с помощью численных методов поиска экстремумов функции координат ядер. Осуществляется это с помощью молекулярной механики – метода для расчёта геометрии и энергии молекул. Основная идея молекулярной механики основана на существовании в молекуле длин связей и валентных углов, равновесные значения которых используются в функции потенциальной энергии и называются параметрами силового поля. Правильность молекулярно-механических расчетов зависит от подобранной функции потенциальной энергии и соответствующих параметров. Поэтому для всех силовых полей важно подобрать правильные параметры для определенных типов атомов в аминокислотах (центральный атом обозначается α , атомы боковой цепи именуется β , γ , δ , ϵ , ζ), типов и длин связей, валентных и торсионных углов (ϕ , ψ , ω), и только тогда они могут быть применены для конкретной задачи.

Возможные варианты углов ϕ и ψ геометрически ограничены в виду стерических взаимодействий с соседними непосредственно не связанными атомами. Чтобы определить разрешенные значения ϕ и ψ , используют грубую модель, в которой атомы представляют как жесткие сферы, а геометрия связей фиксирована. Для каждой конформации с определёнными значениями указанных углов ищутся близкие межатомные контакты. Считаются разрешенными те значения ϕ и ψ , для которых в данной модели не находятся близкие контакты. Представление их в виде двумерной карты называется картой

Рамачандрана. С её помощью точно проверяют достоверность трехмерной структуры белка, так как углы ϕ и ψ практически полностью описывают конформацию основной цепи. [15]

Атомы в молекуле рассматриваются в данном методе как набор материальных точек, взаимодействующих между собой посредством гармонических сил. При данном упрощении для вычисления потенциальной энергии атомного ансамбля используют закон Гука:

$$E_{tot} = E_{str} + E_{bend} + E_{tors} + E_{vdw} + E_{elec} + \dots, \quad (6)$$

где E_{tot} – полная энергия молекулы; E_{str} – энергия деформации связей; E_{bend} – энергия деформаций валентных углов; E_{tors} – энергия деформации торсионных углов; E_{vdw} – энергия ван-дер-ваальсовских взаимодействий; E_{elec} – энергия электростатического взаимодействия. Первое слагаемое описывает изменение энергии в момент сжатия либо растяжения связи. Предполагается, что межатомные силы гармонические и могут быть определены следующей формулой:

$$E_{str} = \frac{1}{2}k_b(b - b_0)^2, \quad (7)$$

где k_b – силовая константа; b_0 – начальная длина связи; b – текущая длина.

Деформации валентных узлов описываются уравнением

$$E_{bend} = \frac{1}{2}k_0(\theta - \theta_0)^2, \quad (8)$$

где k_0 – силовая константа, θ – текущее значение валентного угла, θ_0 – равновесное значение.

Вклад в потенциальную энергию вращения вокруг двугранных углов задается выражением:

$$E_{tors} = \frac{1}{2}k_\phi(1 + \cos(n\phi - \phi_0)), \quad (9)$$

где k_ϕ – торсионный барьер (барьер вращения); ϕ – текущее значение двугранного угла; n – число минимумов энергии на один полный цикл; ϕ_0 – стандартное значение торсионного угла.

Ван-дер-ваальсовы взаимодействия выражаются потенциалом

Леннарда-Джонса:

$$E_{vdw} = \sum \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B}{r_{ij}^6} \quad (10)$$

где A_{ij} – коэффициент отталкивания; B_{ij} – коэффициент притяжения; r_{ij} – расстояние между атомами i и j .

Вклад электростатических сил выражается уравнением, по сути, представляющем собой кулоновское взаимодействие:

$$E_{elect} = \frac{1}{\varepsilon} \frac{Q_1 Q_2}{r} \quad (11)$$

где ε – диэлектрическая проницаемость; Q_1, Q_2 – заряды на взаимодействующих атомах; r – межатомное расстояние [15].

4.1 Конформационный анализ методами молекулярной механики

Соединения, содержащие в себе несколько простых связей, в любой момент времени существуют в виде ансамбля конформеров, поскольку молекулы не являются абсолютно жесткими. Причем наиболее вероятно в определенный момент времени зафиксировать низкоэнергетические положения. В таком случае переходы между конформерами можно рассматривать как изменение многомерной поверхности, отображающей изменение потенциальной энергии молекулы при отклонении ее геометрии от «идеальной». Соответственно, молекула может иметь множество минимумов (локальных) и один глобальный.

Если механическая система напряжена, то молекула деформируется в предсказуемом направлении согласно градиенту энергии, и эта деформация может быть рассчитана. Во всех методах молекулярной механики решается система уравнений Ньютона для β атомов в молекуле:

$$F_i(t) = m_i \cdot a_i(t), \quad (12)$$

где $F_i(t)$ – сила, действующая на атом i , m – масса i -го атома, $a_i(t)$ – ускорение i -го атома. Получить движение молекулы во времени – основная цель данного метода.

В высокотемпературном моделировании необходимо обеспечить молекулу достаточной кинетической энергией, чтобы она могла преодолеть барьеры, разделяющие конформации. Если процедуры минимизации недостаточно, то используют метод имитации отжига (simulated annealing). Суть метода заключается в том, чтобы проводить оптимизацию, постепенно понижая температуру через постоянные промежутки времени. Когда температура близка к абсолютному нулю, система находится в конформации с минимальной энергией.

Кроме того, знание водородных связей и их сил важно в определении структуры белков и их движения [24, 25]. Экспериментально доказано, что сила для таких водородных связей варьируется от 5-6 ккал/моль (для изолированных связей) до 0,5-1,5 ккал/моль (для белков в растворе) [24].

Водородные связи являются основным структурным фактором, управляющим активными конфигурациями путем связывания структуры белка в равновесие. Создание и разрушение водородных связей сильно влияет на скорость и динамическое равновесие, которое ответственно за биологическую активность белков. Также имеет значение среда; действие водородных связей в изолированных средах сильно отличается от действия в водной среде. Фазовое пространство способствует влиянию энтропии на водородные связи, особенно в воде, тем самым изменяя свободную энергию этих связей [24]. Уменьшение свободной энергии необходимо для легкого сворачивания и разворачивания белков. Для расчета изменений свободной энергии, вызванных разрывом водородных связей, широко используются методы молекулярной динамики. На практике в разработке лекарств большой

интерес представляет общий метод прямой оценки изменения сил водородных связей в зависимости от микроскопической среды белков.

4.2 Метод отжига

Имитация отжига – общая форма глобальной оптимизации, основанная, как следует из названия, на аналогии со свойством металлов при охлаждении – в момент с минимальной энергией металлы застывают в кристаллическую структуру (процесс отжига). Метод использует для оптимизации целевую функцию $f(x)$, которая задается на дискретном либо непрерывном пространстве S . Множеством пространства S являются энергетические уровни, соответствующие состояниям системы, значения функции f на которых определяются как энергия системы $E = f(x)$.

Основным преимуществом симулированного отжига по сравнению с другими методами является возможность избежать попадания в один из локальных минимумов. Алгоритм использует случайный поиск, который принимает не только изменения, которые уменьшают целевую функцию f , но также некоторые изменения, которые увеличивают ее. Контрольным параметром в алгоритме является температура T (аналог температуры в системе отжига), которая задается в каждый момент времени и по большей части уменьшается со следующим шагом. В заданный момент времени с температурой T система генерирует следующее состояние в соответствии с вероятностным распределением $Q(x, T)$; задается новый случайный элемент $x' = G(x, T)$. Переход на новое состояние осуществляется с вероятностью $h = (\Delta E, T)$, где $\Delta E = f(x') - f(x)$; h – вероятность принятия нового состояния [26]. Функция $h = (\Delta E, T)$ задается квантовой статистикой Ферми-Дирака:

$$h(\Delta E, T) = \frac{1}{1 + \exp(\Delta E/T)} \quad (13)$$

либо ее приближением:

$$h(\Delta E, T) = (-\Delta E/T) \quad (14)$$

Второй вариант более удобен, так как в этом случае вероятность $h = (\Delta E, T)$ при $\Delta < 0$ считается равной 1. Если значение оптимизированной функции для нового состояния лучше предыдущего, то переход в это состояние произойдет точно [27].

В общем случае для реализации алгоритма метода симулированного отжига должны быть определены следующие параметры:

- 1) Закон изменения температуры $T(k)$, где k – номер шага;
- 2) Функция распределения вероятностей $Q(x, T)$;
- 3) Функция вероятности принятия нового состояния $h = (\Delta E, T)$.

Сам алгоритм состоит из двух этапов:

- 1) Случайным образом выбирается начальная точка $x = x_0, x_0 \in S$; энергия в данный момент определяется как $E = f(x_0)$.
- 2) В процессе k -ого повторения математической операции:
 - а) Сравнивается энергия системы E в состоянии x с найденным на текущий момент глобальным минимумом. Если $E = f(x)$ меньше, то устанавливается новое значение глобального минимума;
 - б) Генерируется новая точка $x' = G(x; T(k))$;
 - в) Производится вычисление значения функции в этой точке $E' = f(x')$;
 - г) Генерируется случайное число α из интервала $[0; 1]$;
 - д) Если $\alpha < h(E' - E; T(k))$, то установить $x \leftarrow x'$; $E \leftarrow E'$ и перейти к следующему повторению операции. Иначе повторить шаг (б), пока не будет найдена подходящая точка x' .

5 Объекты исследования

Самым известным циклическим пептидом является циклоспорин А (CsA). Он широко используется в медицине в качестве иммунодепрессанта [14]. Его иммуноподавляющая активность обусловлена связыванием с белком циклофилином, что сопровождается цис-транс изомеризацией пептидной связи [28]; полученный комплекс действует в качестве ингибитора кальциневрина, участвующего во многих иммунных реакциях [29, 30], тем самым подавляя β активность Т-клеток, а, следовательно, и иммунной системы. Также помимо иммуносупрессивной активности, CsA обладает противовоспалительными, противогрибковыми и противопаразитарными свойствами. Однако мало что известно о вариантах циклоспорина, помимо CsA.

Объектами исследования являются циклические пептиды алиспоривир (DEB-02) и циклоспорин L (CsL). По химической структуре циклоспорин L и алиспоривир аналогичны циклоспорину А (CsA), при этом CsL имеет отличие в аминокислотном остатке в 1 позиции (отсутствует N-метилирование амидной группы остатка Bmt1), а алиспоривир (Debio025) – в остатках 3 и 4. Алиспоривир ингибирует циклофилин А и не обладает иммунодепрессивным действием. В настоящее время исследуются возможности его использования при лечении гепатита С [31]. Циклоспорин L является мало изученным вариантом циклоспорина. Образцы представляли собой растворы указанных пептидов в дейтерированном хлороформе. Для получения информации о пространственной структуре молекул были проанализированы 2D ROESY спектры, записанные при времени смешивания $\tau_m = 300$ мс на рабочей частоте протонного резонанса 700 МГц (Bruker Avance III HD 700). Получены значения интегральной интенсивности для отдельных кросс-пиков, отвечающих протонам NH,

Ha и NCH3 групп. Структура образцов представлена на рисунках 12 и 13

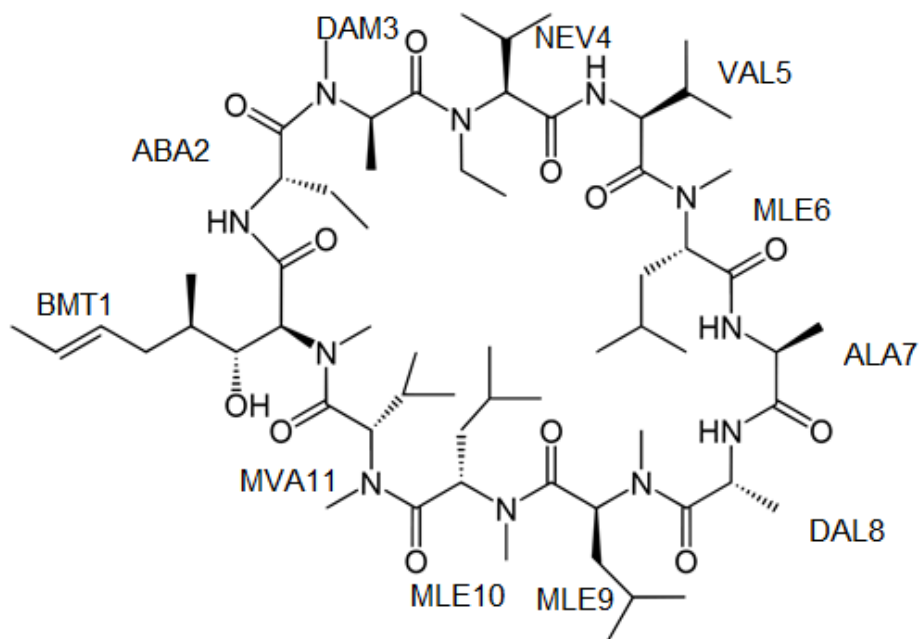


Рисунок 12 – Алиспоривир Debio 025 [(Me)Bmt(E)-Abu-DN(Me)Ala-N(Et)Val-Val-N (Me) Leu-Ala-D-Ala-N(Me)Leu-N(Me)Leu-N(Me)Val-N]

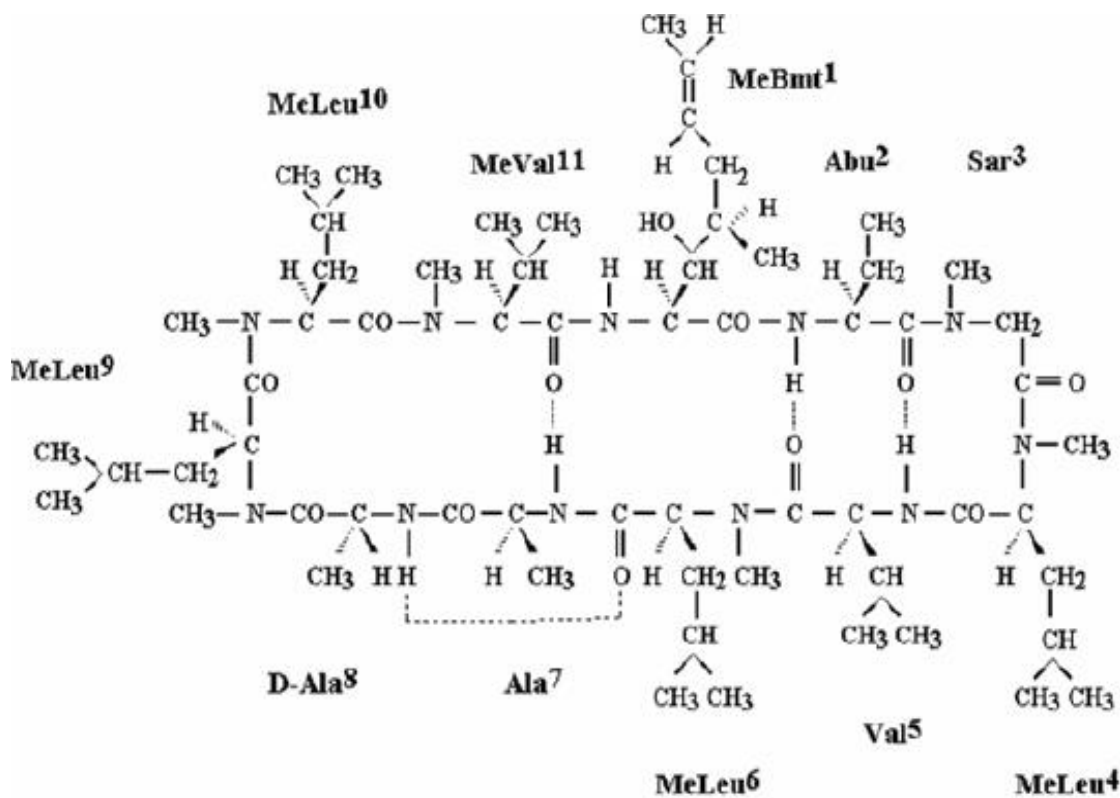


Рисунок 13 – Циклоспорин L CsL [Bmt(E)-Abu-Sar-N(Me)Leu-Val-N(Me)Leu-Ala-D-Ala-N(Me)Leu-N(Me) Leu-N(Me)Val]

6 Результаты экспериментов

Спектры ЯМР были зарегистрированы на спектрометре Bruker Avance III HD 700. Было проведено несколько многомерных экспериментов в растворителе $CDCl_3$. Обработка спектров проводилась с помощью программного обеспечения спектрометра TopSpin; соотнесение сигналов проводилось с помощью программы Sparky. Для соотнесения сигналов использовались двумерные гомоядерные эксперименты TOCSY, COSY, ROESY.

По результатам экспериментов были получены интегральные интенсивности протонов и получены межатомные расстояния.

Таблица 2 – Отобранные пары атомов в алиспоривире и циклоспорине L, экспериментальные и полученные в ходе моделирования расстояния

Debio 025	NOE (Å)	221.pdb(Å)	CsL	NOE Å	116.pdb(Å)
ABU2HN-HA	3,32	2,90	BMT1HN-HA	2,5	2,30
VAL5HN-HA	3,10	2,94	ABU2HN-HA	3,42	2,99
ALA7HN-HA	2,77	2,96	VAL5HN-HA	2,74	2,32
DAL8HN-HA	2,82	2,91	ALA7HN-HA	2,77	2,85
ABU2HN-BMT1HA	2,39	2,15	DAL8HN-HA	2,51	2,30
ALA7HN-BMT1HA	3,29	3,32	ABU2HN-VAL5HA	2,15	2,36
ALA7HN-MLE6HA	2,27	2,63	ALA7HN-MLE6HA	2,21	2,44
DAL8HN-Ala7HA	3,03	2,88	BMT1NH-MVA11HA	2,11	2,42
MVA11HA-BMT1CN	3,52	2,76	ABU2HA-SAR3CN	3,74	2,59
ABU2HA-DAM3CN	3,56	3,93	VAL5HA-MLE6CN	3,38	2,79
VAL5HA-MLE6CN	3,44	2,80	DAL8HA-MLE9CN	3,97	2,88

DAL8HA-MLE9CN	3,52	2,77	MLE10HA-MVA11CN	3,72	2,51
MLE10HA-MVA11CN	3,60	2,59	VAL5HN-MLE4CN	4,22	2,91
BMT1HB-CN	4,32	2,96	ALA7HN-MLE10CN	4,44	5,87
MLE9HA-MLE10HA	2,11	2,25	MLE9HA-MLE10HA	2,15	1,91
BMT1HA-MLE6HA	3,10	3,23	BMT1HA-HB	2,36	2,54
VAL5HA-HB	3,00	3,03	VAL5HA-HB	2,83	3,01
DAM3HA-NEV4HNB2	2,34	2,16	MVA11HA-HB	2,49	2,42
NEV4HNB1-HNB2	1,8	1,76	MLE9Hb1-Hb2	1,8	1,76

В данном методе погрешность измерений межатомных расстояний составляет около 10%. В качестве стандартной пары протонов с известным расстоянием была выбрана CH_2 -группа в фрагменте $-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ остатка Eva4 в алиспоривире и $-\text{CH}_2$ остатка Abu2 в циклоспорине L.

По обнаруженным взаимодействиям между парами атомов можно сделать вывод, что существует различие в строении между CsL и Debio025. Так, например, отсутствуют некоторые связи между аналогичными протонами, но, в основном, между подобными парами атомов расстояния одинаковы в пределах погрешности.

Моделирование проводилось в программе XPLOR-NIH путём симулированного отжига. Расчет проводился с шаблонной структуры, построенной на основе известной структуры циклоспорина A. Затем был создан ансамбль структур с использованием метода симулированного отжига с учетом расстояний, указанных в таблице 2, и значений углов ϕ для остатков с NH- группой. Было смоделировано 2000 структур, из которых было отобрано 10 с наименьшей энергией.

Для выбранного набора структур был рассчитан двугранный угол ϕ . В пептидах он определяется как угол $-\text{N}-\text{CA}-$. Полученные результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Экспериментальные значения двугранного угла ϕ в молекулах циклоспорина L и алиспоривира для отобранных 10 структур

Значения угла ϕ алиспоривира											
№	BMT1	ALA2	NDA3	EVA4	VAL5	LEU6	ALA7	ALA8	LEU9	LEU10	VAL11
1	-12,19	-87,45	-44,53	-116,34	-148,72	56,33	81,89	-58,73	-140,52	-152,70	-138,97
2	-18,28	-156,83	-159,01	57,09	-145,87	66,83	-120,39	87,34	-157,20	-149,36	-123,40
3	42,07	-115,51	-54,06	65,66	-153,39	-10,84	-176,74	76,08	-145,02	-154,38	-142,37
4	22,76	-152,59	-35,24	54,33	-34,05	-109,78	-92,48	70,29	-24,46	-167,35	87,39
5	17,39	-67,35	-40,93	-129,00	-149,79	60,71	64,58	-70,80	-156,87	-146,96	-147,58
6	55,60	-149,00	-38,22	-104,61	-41,32	-104,28	-156,24	68,86	-143,28	-150,82	-134,56
7	-5,57	-163,85	-158,44	61,48	-142,24	58,10	85,14	49,15	-141,43	-152,53	-149,49
8	40,55	-142,85	92,38	31,49	-144,04	-24,87	175,48	-57,36	-146,21	-150,02	-138,11
9	53,35	-173,95	36,89	58,28	-136,47	-89,15	-162,31	54,25	-145,89	-152,80	-141,61
10	-23,16	-143,70	135,23	-130,62	-132,32	-24,32	-158,56	45,79	-150,48	-152,31	-130,08
Значения угла ϕ циклоспорина L											
№	BMT1	ALA2	SAR3	LEU4	VAL5	LEU6	ALA7	ALA8	LEU9	LEU10	VAL11
1	52,64	-127,89	-35,08	-118,70	39,51	-156,41	-171,00	-59,52	-100,19	-156,06	45,43
2	-20,38	-148,61	-42,71	52,42	41,61	78,89	-119,54	164,00	-127,92	-162,41	157,12
3	56,56	-140,28	-30,48	-107,23	-32,07	80,78	-151,79	-72,13	-110,27	-157,75	66,07
4	55,61	-137,02	-21,71	-104,43	34,80	87,71	168,96	-57,32	-144,40	-155,39	-176,59
5	36,44	-151,85	-27,32	-112,87	-27,78	41,23	-123,28	172,48	-130,58	-158,28	81,56
6	49,86	-139,93	-37,37	61,89	52,49	86,83	-166,96	43,80	59,84	-77,92	165,17
7	55,70	-144,96	-33,67	45,22	-38,02	86,15	88,37	-58,19	40,41	-159,47	-158,56
8	-54,45	-131,12	-34,56	-98,81	29,72	-160,40	-168,65	114,62	41,36	-153,96	-30,68
9	54,72	-148,81	-42,57	55,87	54,53	85,90	169,46	71,72	-133,59	-159,69	156,93
10	-28,04	-138,81	-35,73	-96,61	-32,38	81,91	-167,58	45,67	59,16	-83,23	-33,75

На основе этих данных для оценки качества полученных структур был построен график Рамачандрана (рисунок 14, 15). Карта Рамачандрана указывает на структуру типа β -листа. Некоторые точки попадают в область, далёкую от оптимальной, однако, среди структур, полученных в результате моделирования, были выбраны две, которые удовлетворяют результатам и меньше всего отклоняются от возможных значений.

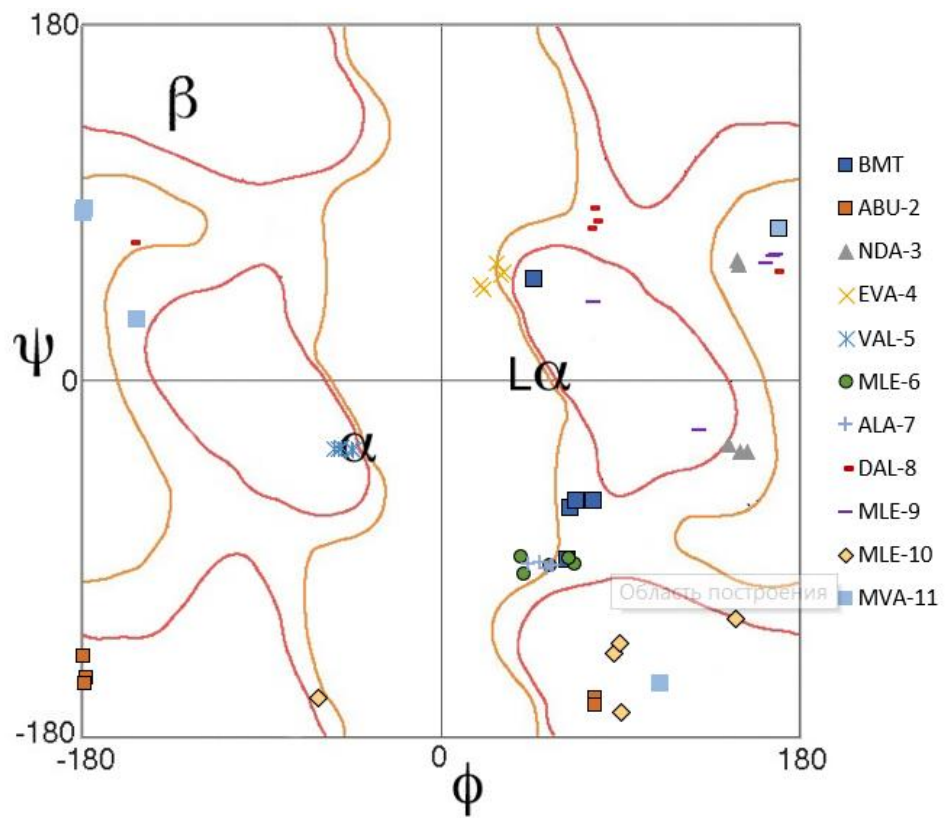


Рисунок 14 – Карта Рамачандрана со значениями двугранных углов алиспоривира

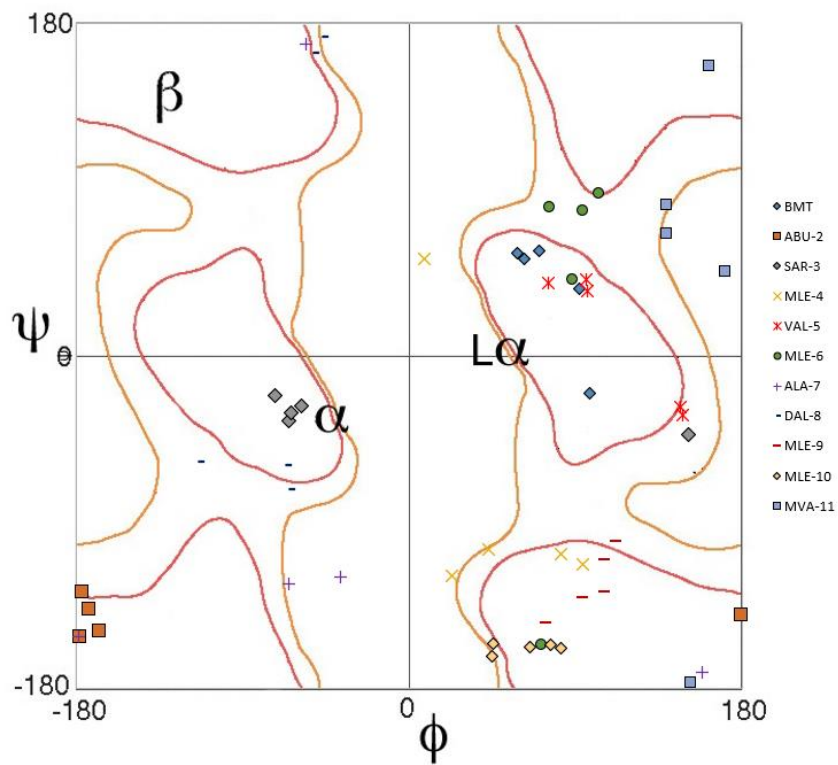


Рисунок 15 – Карта Рамачандрана со значениями двугранных углов циклоспорина L

Молекулы, сгенерированные в XPLOR, были визуализированы и проанализированы с помощью программы Chimera. Расчётные структуры были сопоставлены друг с другом. Изображения выбранных моделей представлено на рисунках 16 и 17.

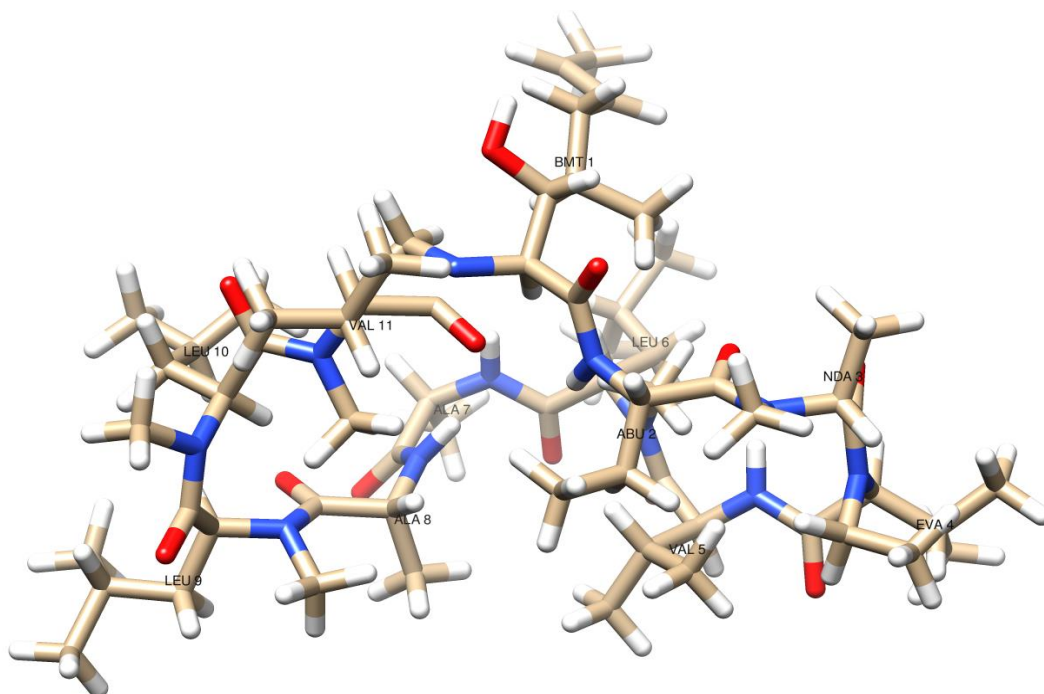


Рисунок 16 – 3D модель молекулы алиспоривира Debio025

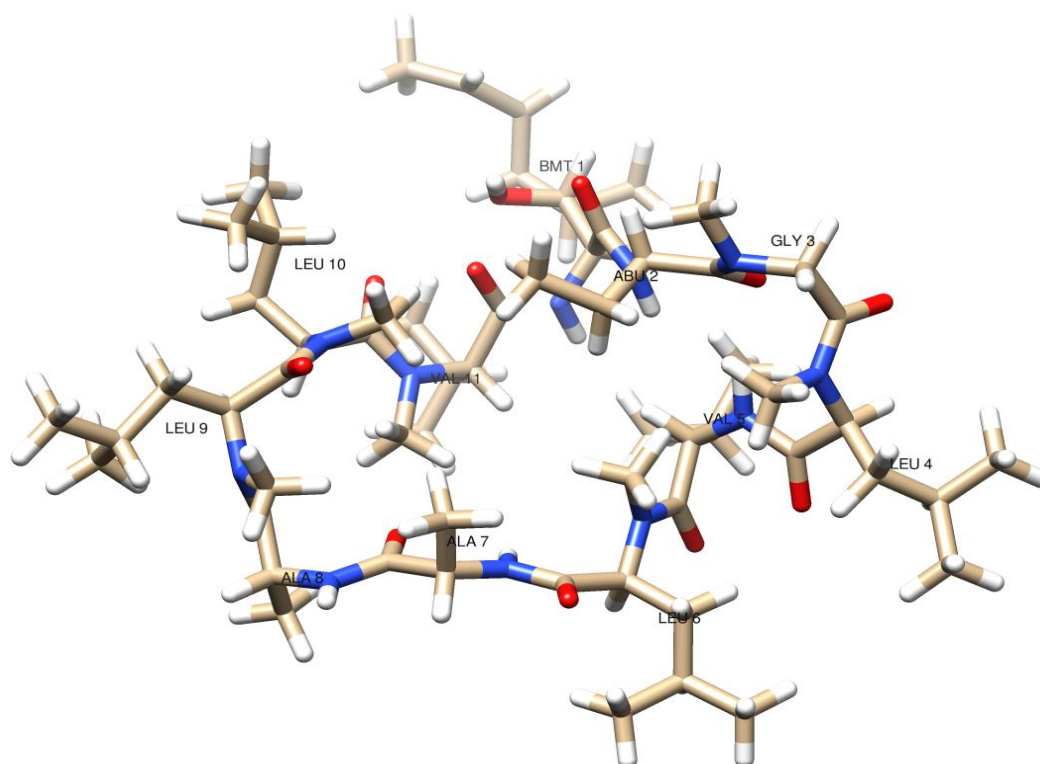


Рисунок 17 – 3D модель молекулы циклоспорина L

Заключение

Объектом исследования являются циклические пептиды алиспоривир и циклоспорин L.

1. Зарегистрированы двумерные спектры DQF-COSY, TOCSY, ROESY и HSQC и произведено полное соотнесение сигналов ЯМР ^1H и ^{13}C .
2. Проинтегрированы сигналы ROESY, и затем по полученным значениям рассчитаны межатомные расстояния в близких протонных парах.
3. Найдена пространственная структура алиспоривира и циклоспорина L при помощи молекулярного моделирования (метод симулированного отжига в программе XPLOR). Оба пептида по результатам моделирования имеют вид сплюснутого кольца, в котором близко друг к другу подходят аминокислотные остатки Bmt1 и Mle6; в случае алиспоривира это также подтверждается спектром ROESY.
4. Качество результатов подтверждено графиком Рамачандрана.

Проведенные исследования и результаты, полученные в настоящей работе, предоставляют много возможностей для дальнейших исследований. Основными подходами для будущих исследований в этой области может быть проведение исследований на большем количестве образцов из семейства циклоспоринов, чтобы прояснить взаимосвязь между структурной формулой соединения и его активностью.

Список литературы

1. Gang, D. Cyclic Peptides: Promising Scaffolds for Biopharmaceuticals / D. Gang, D. Kim, H. Park // *Genes*. – 2018. – Vol. 9, no. 11. – P. 557. – DOI 10.3390/genes9110557
2. Племенков, В.В. Введение в химию природных соединений / В.В. Племенков. – Казань, 2001. – 376 с.
3. Structural Diversity and Biological Activities of Fungal Cyclic Peptides, Excluding Cyclodipeptides / X. Wang, M. Lin, D. Xu et al. // *Molecules*. – 2017. – Vol. 22, no. 12. – P. 2069. – doi:10.3390/molecules22122069
4. Cyclic Peptide Design Guided by Residual Dipolar Couplings, J-Couplings, and Intramolecular Hydrogen Bond Analysis / K. Farley, Y. Che, A. Navarro-Vázquez et al. // *The Journal of Organic Chemistry*. – 2019. – Vol. 84, no. 8. – P. 4803-4813. – DOI: 10.1021/acs.joc.8b02811
5. Oral Lichen Planus in Childhood / R. Laeijendecker, T. Van Joost, B. Tank et al. // *Journal of Pediatric Dermatology*. – 2005. – Vol. 22, no. 4. – P. 299-304.
6. Circular Proteins from Plants and Fungi / U. Göransson, R. Burman, S. Gunasekera et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – Vol. 287, no. 32. – 27001-27006.
7. Gams, W. Tolypocladium, eine Hyphomycetengattung mit geschwollenen Phialiden / W. Gams // *Persoonia*. – 1971. – Vol. 6, no. 2. – P. 185-191.
8. *Plasmodium falciparum* calcineurin and its association with heat shock protein 90: mechanisms for the antimalarial activity of Cyclosporin A and synergism with geldanamycin / R. Kumar, A. Musiyenko, S. Barik et al. // *Journal of Molecular and Biochemical Parasitology*. – 2005. – Vol. 141. – P. 29-37.
9. Crystal structure of calcineurin–cyclophilin–cyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin–drug complexes / Q. Huai, H.-Y. Kim, Y. Liu et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2002. – Vol. 99, no. 19. – P. 12037-12042.

10. Neue cyclopeptide aus *Trichoderma polysporum* (LINK EX PERS.) RIFAI: Die cyclosporine B, D and E / M. Kuhn, H. R. Loosli, W. Pache et al. // *Helvetica Chimica Acta*. – 1977. – Vol. 60. – P. 1568-1578. – DOI 10.1002/hlca.19770600513
11. Kobel, H. Directed biosynthesis of cyclosporins / H. Kobel, R. Traber // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 1982. – Vol. 14. – P. 237-240.
12. Neue cyclosporine aus *Tolypocladium inflatum*. Die cyclosporine K–Z / R. Traber, H. Hofmann, H. R. Loosli et al. // *Helvetica Chimica Acta*. – 1987. – Vol. 70. – P. 13–36. – DOI 10.1002/hlca.19870700103
13. Mikol, V. The role of water molecules in the structure-based design of (5-hydroxynorvaline)-2-cyclosporin: synthesis, biological activity, and crystallographic analysis with cyclophilin A / V. Mikol, C. Papageorgiou, X. Borer // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 1995. – Vol. 38. – P. 3361-3367.
14. Analysis of cyclosporine A and its metabolites in rat urine and feces by liquid chromatography–tandem mass spectrometry / Z. Fang, B. You, Y. Chen et al. // *Journal of Chromatography B*. – 2010. – Vol. 878. – P. 1153- 1162.
15. Молекулярное моделирование / Х.-Д. Хельтзе, В. Зиппль, Д. Роньян, Г. Фолькерс. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний. – 2010. – 318 с. – ISBN 978-5-9963-0156-0
16. Muller, P. Glossary of terms used in physical organic chemistry (IUPAC Recommendations 1994) / P. Muller // *Pure & Appl. Chem*. – 1994. – Vol. 66, no. 5. – P. 1077-1184.
17. Rule, G.S. *Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy* / G.S. Rule, T.K. Hitchens. – Pittsburgh : Carnegie Mellon University, Springer, 2006. – P. 169-205.
18. Keeler, J. *Understanding NMR Spectroscopy* / J. Keeler. – Chichester : Wiley, 2010. – 460 p.
19. Akitt, J.W., Mann, B.E. *NMR and Chemistry*. – Cheltenham, UK: Stanley Thornes Ltd, 2000. – 400 с. – Текст : непосредственный.
20. *Cyclic Peptide Design Guided by Residual Dipolar Couplings, J-Couplings,*

- and Intramolecular Hydrogen Bond Analysis / K. Farley, Y. Che, A. Navarro-Vázquez et al. // *The Journal of Organic Chemistry*. – 2019. – Vol. 84, no. 8. – P. 4803-4813. – DOI: 10.1021/acs.joc.8b02811
21. Oral Lichen Planus in Childhood / R. Laeijendecker, T. Van Joost, B. Tank et al. // *Journal of Pediatric Dermatology*. – 2005. – Vol. 22, no. 4. – P. 299-304.
22. Kahan, B.D. Cyclosporine / B.D. Kahan // *New Engl. J. Med.* – 1989. – V. 321. – P. 1725-1738. – DOI 10.1056/NEJM198912213212507
23. Macura, S. An Improved Method for the Determination of Cross-Relaxation Rates from NOE Data / S. Macura, B.T. Farmer II, L.R. Brown // *Journal of Magnetic Resonance*. – 1986. – V. 70. – P. 493-499.
24. Energetics of hydrogen bonds in peptides / S.-Y. Sheu, D.-Y. Yang, H. L. Selzle et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2003. – Vol. 100, no. 22. – P. 12683-12687.
25. Contribution of Hydrogen Bonds to Protein Stability / C.N. Pace, H. Fu, K.L. Fryar et al. // *Protein Science*. – 2014. – Vol. 23, no. 5. – P. 652-661. – DOI 10.1002/pro.2449
26. Лопатин, А.С. Метод отжига / А.С. Лопатин. – Текст : электронный // Санкт-Петербургский Государственный Университет : [сайт]. – URL: <http://www.math.spbu.ru/user/gran/sb1/lopatin.pdf> (дата обращения 15.06.2022)
27. The GROMOS Biomolecular Simulation Program Package / W.R.P. Scott, P.H. Hünenberger, I. G. Tironi et al. // *The Journal of Physical Chemistry A*. – 1999. – Vol. 103, no. 19. – P. 3596-3607.
28. Structures of the Contryphan Family of Cyclic Peptides. Role of Electrostatic Interactions in cis-trans Isomerism / P.K. Pallaghy, W. He, E.C. Jimenez et al. // *Biochemistry*. – 2000. – Vol. 39. – P. 12845-12852.
29. Shaw, R.A. Solvent influence on the conformation of cyclosporin. An FT- IR study / R.A. Shaw, H.H. Mantsch, B.Z. Chowdhry // *Canadian Journal of Chemistry*. – 1993. – Vol. 71. – P. 1334-1339.

30. Thomson, A.W. New Immunosuppressive Drugs: Mechanistic Insights and Potential Therapeutic Advances / A.W. Thomson, T.E. Starzl // Immunological Reviews. – 1993. – Vol. 136. – P. 72-92.
31. Gallay, P.A. Profile of alisporivir and its potential in the treatment of hepatitis C / P.A. Gallay, K. Lin // Drug Design, Development and Therapy. – 2013. – V. 7. – P. 105–115.