

УДК 541.12.038.2:536.75:536.728

**ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ ДЕКАПЕПТИДА
Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly, ОПРЕДЕЛЕННОЕ
АНАЛИЗОМ ВЕЛИЧИН ОСТАТОЧНОГО
ДИПОЛЬ-ДИПОЛЬНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ**

*Д.С. Блохин, С.В. Ефимов, А.В. Клочков, А.Р. Юльметов,
А.В. Филиппов, В.В. Клочков*

Аннотация

Подход, основанный на анализе величин остаточного диполь-дипольного взаимодействия между магнитными ядрами ^{13}C и ^1H , разделенных одной химической связью (^1D), в молекулах, частично ориентированных в лиотропных жидкокристаллических средах, использован при ЯМР-исследовании строения декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly в лиотропной среде [*n*-алкил-поли(этилен)гликоль (C_{12}E_5) / *n*-гексанол в воде]. На основании анализа экспериментальных величин остаточного диполь-дипольного взаимодействия определено пространственное строение декапептида.

Ключевые слова: структура, олигопептиды, лиотропные жидкокристаллические среды, ЯМР ^1H и ^{13}C спектроскопия, двумерная ЯМР (TOCSY, HSQC, HMBC, NOESY) спектроскопия.

Введение

Известно, что некоторые короткие пептидные последовательности, синтезируемые клеткой, являются частью иммунной системы живого организма [1–4] и эти антимикробные пептиды, содержащие от 10 до 30 аминокислотных остатков, сегодня являются объектами активных структурных исследований. Декапептид Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly (рис. 1) относится к такому классу водорастворимых олигопептидов, обладающих фармакологическим (противовоспалительным) действием. Очевидно, что знание пространственного строения декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly в растворе позволит подойти к фундаментальному пониманию механизмов его воздействия на молекулярном уровне на протекающие процессы в клетках.

В работе применен подход, основанный на анализе величин остаточного диполь-дипольного взаимодействия между магнитными ядрами ^{13}C и ^1H , разделенными одной химической связью (^1D), для определения пространственного строения декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly относительно небольшой молекулы, частично ориентированной в лиотропной жидкокристаллической среде. С недавних пор этот подход активно используется при исследованиях методом ЯМР биохимических объектов, попадающих под условие медленного движения ($\omega_0 \cdot \tau_c \gg 1$, τ_c – время корреляции, ω_0 – угловая скорость

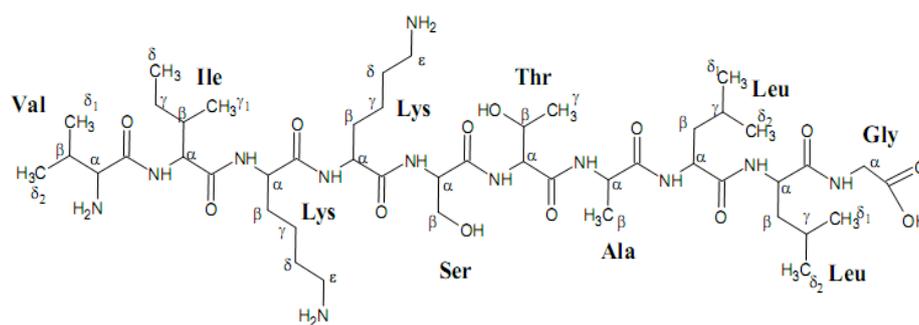


Рис. 1. Структурная формула декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly

прецессии магнитных ядер) [5, 6], что позволяет независимым образом судить о структуре этих соединений в растворах.

Приложения данного подхода к определению пространственного строения небольших органических соединений в растворе в литературе лишь начали появляться [7–11]. Значимость самого подхода возрастает, если учесть, что применение метода двумерной NOESY ЯМР-спектроскопии к относительно малым молекулам не всегда эффективно [12, 13]. Последнее обусловлено малыми временами корреляции τ_c таких молекул в растворе, что приводит к слабым по интенсивностям кросс-пикам в двумерных ЯМР NOESY спектрах.

Экспериментальная часть

Регистрация ЯМР ^1H (500 МГц) и ^{13}C (125.69 МГц) спектров декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly в изотропном растворителе и лиотропной жидкокристаллической смеси проводилась на ЯМР-спектрометре «AVANCE II-500» фирмы «Bruker». Спектрометр работает в режиме внутренней стабилизации по линии резонанса ^2H . При записи спектров ЯМР ^1H использовались 90° -импульсы и задержки между импульсами равнялись 2 с; ширина спектра была 9.40 м.д.; число накоплений от 10. При записи спектров ЯМР ^{13}C применялись 45° -импульсы и использовалась (или не использовалась) широкополосная развязка от протонов; задержки между импульсами равнялась 2 с; ширина спектра была равной 200 м.д., число накоплений от 4000 до 8000, применялась цифровая экспоненциальная фильтрация с константой, равной 2–4 Гц. Двумерные спектры 2D HSQC и HMBC [14] использовались для отнесения сигналов в спектрах ЯМР ^{13}C декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly. Образцы представляли собой растворы соединения в соответствующих средах, концентрации веществ 0.5% (весовых) при записи ЯМР ^1H и ^{13}C спектров. Отсчет химических сдвигов производили от линий резонанса эталонных жидкостей. Ошибка в определении величин диполь-дипольного взаимодействия не превышала 1 Гц.

При проведении двумерных ЯМР-экспериментов (NOESY-модификация) в молекулярной системе время задержки между последовательностями импульсов было втрое большим, чем усредненное время продольной релаксации T_1 для протонов декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly. Спектры записывались с использованием фазочувствительной методики для 1024 точек

F2-координаты и 256 точек F1-координаты; использовалась экспоненциальная фильтрация вдоль обеих координат. Параметр времени смешивания τ_m выбирался равным 0.2, 0.4, 0.6 и 0.8 с.

Остаточные величины диполь-дипольного взаимодействия между магнитными ядрами в декапептиде Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly определялись в смеси *n*-алкил-поли(этилен)гликоль [C₁₂E₅, где 12 – число атомов углерода в *n*-алкильной группе, а 5 – число гликольных групп в поли(этилен)гликоле] / *n*-гексанол в воде [5.6% (весовых)] молярное отношение (*r*) *n*-алкил-поли(этилен)гликоль к *n*-гексанолу было равно 0.96. Существование ламеллярной L_α-фазы подтверждалось наблюдением квадрупольного расщепления ²H ЯМР-сигнала дейтерированной воды (D₂O) [6], входящей в состав жидкокристаллической системы. Жидкокристаллическая система на основе *n*-алкил-поли(этилен)гликоля и *n*-гексанола готовилась так, как описано в работе [15, 16].

Обсуждение результатов

Известно, что в растворах диполь-дипольное взаимодействие между магнитными ядрами внутри молекулы полностью усредняется, как следствие хаотичного движения молекул. Если же молекулярная система растворена в лиотропной жидкокристаллической системе [5], то, вследствие соударения о магнитно-ориентированные молекулярные образования поступательное и вращательное движение молекул перестает быть изотропным. Эта анизотропия в движении молекул приводит к появлению слабого диполь-дипольного взаимодействия между магнитными ядрами, что проявляется в ЯМР-спектрах как остаточные величины диполь-дипольного взаимодействия, при этом уширение сигналов ЯМР не наблюдается [5, 6].

Регистрируемая величина диполь-дипольного взаимодействия $D_{IJ}(\theta, \varphi)$ между двумя магнитными ядрами I и J в этом случае может быть выражена следующим образом [6]:

$$D_{IJ}(\theta, \varphi) = D_a^{IJ} [(3 \cos^2 \theta - 1) + 3/2 R \sin^2 \theta \cos 2\varphi], \quad (1)$$

где $D_a^{IJ} = -(\mu_0 \hbar / 16 \pi^3) S \gamma_I \gamma_J r_{IJ}^{-3} A_a$. Здесь $A_a = A_{zz} - (A_{xx} + A_{yy})/2$ – аксиальная компонента молекулярного тензора **A**, характеризующего преимущественное пространственное расположение молекулы относительно внешнего магнитного поля; $R = (A_{xx} - A_{yy})/A_{zz}$ – ромбическая компонента; A_{xx} , A_{yy} и A_{zz} – проекции молекулярного тензора **A** на *x*-, *y*- и *z*-направления ортогональной системы координат, связанной с молекулой; θ и φ – полярные координаты межъядерного вектора (I и J ядра), связывающие главные оси молекулярного тензора и направление внешнего магнитного поля; S – параметр порядка, описывающий внутреннюю динамическую подвижность межъядерного вектора; γ_I и γ_J – гиромагнитные отношения ядер I и J; r_{IJ} – расстояние между магнитными ядрами.

Различные жидкокристаллические среды используются для необходимого частичного ориентирования биохимических объектов в магнитном поле. В качестве примера можно привести фосфолипидные бицеллы [5], бактерии [17]

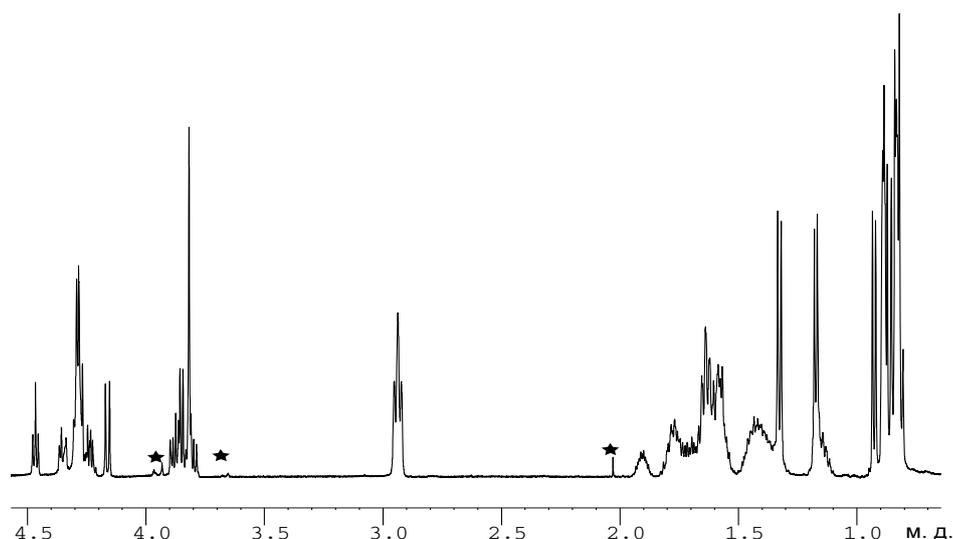


Рис. 2. ЯМР ^1H (500 МГц) спектр декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly в растворе D_2O (звездочкой отмечены сигналы примесей). $T = 298 \text{ K}$, 0 м.д. соответствует сигналу ЯМР ^1H ТМС

Табл. 1

Химические сдвиги ЯМР ^1H протонов (δ_{H} , м.д., относительно ТМС) для декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly, растворенного в изотропном растворителе (D_2O)

α CH Val	β CH Val	γ_1 CH ₃ Val	γ_2 CH ₃ Val	α CH Ile	β CH Ile	γ_1' CH ₂ Ile	γ_1'' CH ₂ Ile	γ_2 CH ₃ Ile	δ CH ₃ Ile
3.85	1.91	0.93	0.85	4.17	1.72	1.45	1.15	0.87	0.82
α CH Lys	β CH ₂ Lys	γ CH ₂ Lys	δ CH ₂ Lys	ϵ CH ₂ Lys	α CH Ser	β CH ₂ Ser	α CH Thr	β CH Thr	γ CH ₃ Thr
4.30	1.64	1.39	1.72	2.94	4.47	3.87/3.81	4.29	4.24	1.17
α CH Ala	β CH ₃ Ala	α CH Leu	β CH ₂ Leu	γ CH Leu	δ_1 CH ₃ Leu	δ_2 CH ₃ Leu	α CH ₂ Gly		
4.28	1.32	4.36/4.29	1.60	1.58	0.83	0.89	3.82		

или фрагменты мембран [18]. Нематические фазы могут быть созданы на основе смесей бромид *n*-цетил-*n,n,n*-триметиламмония, хлорид или бромид цетилпиридина и *n*-гексанола [19, 20]; *n*-алкил-поли(этилен)гликолей и нормальных спиртов в воде [15, 16]. При некоторых условиях перечисленные системы формируют ламеллярные жидкокристаллические фазы, обозначаемые как L_α [6].

ЯМР ^1H спектр декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly представлен на рис. 2 (химические сдвиги приведены в табл. 1). Декапептид был растворен в D_2O , сигнал с $\delta_{\text{H}} = 4.72$ м.д., (не приведен на рис. 2) относится к аминным протонам, протонам карбоксильных групп декапептида и остаточным протонам дейтерированной воды, участвующим в быстром межмолекулярном водородном обмене [8, 9].

Табл. 2

Химические сдвиги ЯМР ^{13}C атомов углерода (δ_{C} , м.д., относительно ТМС) декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly, растворенного в изотропном растворителе

α CH Val	β CH Val	γ_1 CH ₃ Val	γ_2 CH ₃ Val	α CH Ile	β CH Ile	γ_1 CH ₂ Ile	γ_1' CH ₂ Ile	γ_2 CH ₃ Ile	δ CH ₃ Ile
57.3	36.4	13.9	14.4	58.1	35.7	24.5	23.9	10.4	9.8
α CH Lys	β CH ₂ Lys	γ CH ₂ Lys	δ CH ₂ Lys	ϵ CH ₂ Lys	α CH Ser	β CH ₂ Ser	α CH Thr	β CH Thr	γ CH ₃ Thr
53.4/ 53.2	26.3/ 26.2	22.0/ 21.9	30.5/ 30.4	39.0/ 39.0	55.3	60.8	58.9	66.7	18.7
α CH Ala	β CH ₃ Ala	α CH Leu	β CH ₂ Leu	γ CH Leu	δ_1 CH ₃ Leu	δ_2 CH ₃ Leu	α CH ₂ Gly		
49.8	16.3	52.1/ 52.4	39.6/ 39.4	24.2/ 24.2	20.5/ 20.6	22.1/ 21.9	42.1		
C=O Val	C=O Ile	C=O Lys	C=O Lys	C=O Ser	C=O Thr	C=O Ala	C=O Leu	C=O Leu	C=O Gly
169.1	172.7	173.2	173.6	172.1	171.4	174.5	174.4	174.3	174.6

Табл. 3

Значения прямых величин спин-спиновой взаимодействия ($^1J_{\text{CH}} + ^1D_{\text{CH}}$, Гц, нижняя строка) декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly, растворенного в изотропном растворителе и лиотропной жидкокристаллической среде

Среда	α CH Val	β CH Val	γ_1 CH ₃ Val	γ_2 CH ₃ Val	α CH Ile	β CH Ile	γ_1 CH ₂ Ile		
D ₂ O	145.6	132.9	127.1	127.1	140.4	130.5	128.8		
(C ₁₂ E ₅) / <i>n</i> -гексанол	142.6	132.2	125.4	123.3	149.1	122.5	123.2		
	α CH Lys	β CH ₂ Lys	γ CH ₂ Lys	δ CH ₂ Lys	ϵ CH ₂ Lys	α CH Ser	α CH Thr	β CH Thr	γ CH ₃ Thr
D ₂ O	142.1	127.0	132.9	130.2	146.1	143.3	141.8	147.5	126. 9
(C ₁₂ E ₅) / <i>n</i> -гексанол	144.8	126.2	125.5	127.6	145.5	135.6	131.4	148.7	122. 3
	α CH Ala	β CH ₃ Ala	α CH Leu	β CH ₂ Leu	γ CH Leu	δ_1 CH ₃ Leu	δ_2 CH ₃ Leu	α CH ₂ Gly	
D ₂ O	144.2	130.8	141.7	133.0	129.0	126.0	125.0	141.1	
(C ₁₂ E ₅) / <i>n</i> -гексанол	134.2	139.8	128.9/ 135.6	111.1	118.2	123.2	123.9	141.6	

ЯМР ^{13}C спектр декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly (растворенного в D₂O) состоит из 47 синглетных сигналов, химические сдвиги которых сведены в табл. 2. Значения прямых констант спин-спиновой взаимодействия определены из ЯМР-спектров декапептида, растворенного в D₂O или в лиотропной среде – C₁₂E₅ / *n*-гексанол и вода, и представлены в табл. 3.

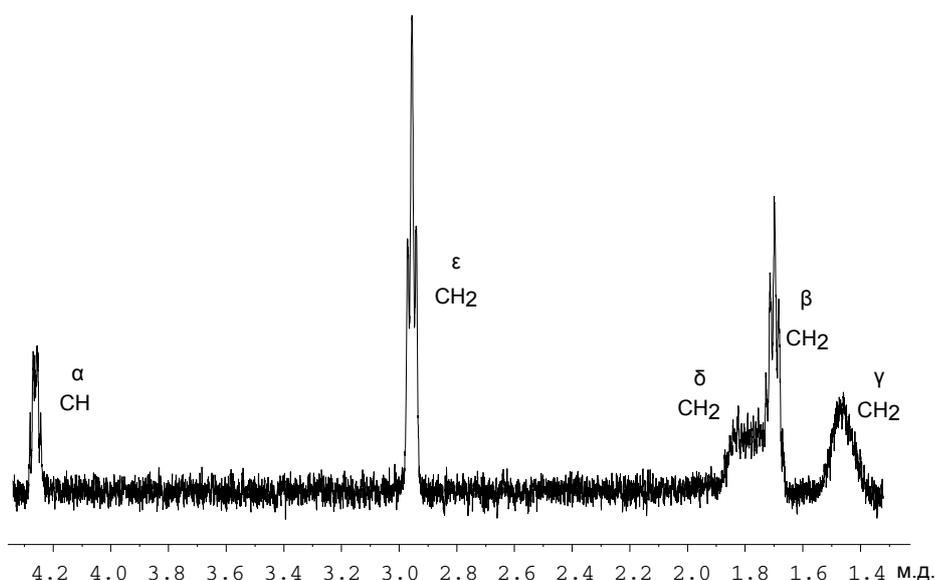


Рис. 3. ЯМР ^1H одномерный селективный TOCSY (500 МГц) спектр декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly в растворе D_2O . $T = 298\text{ K}$, 0 м.д. соответствует сигналу ЯМР ^1H ТМС. Селективному импульсу был подвержен сигнал 2.94 м.д. Обозначены сигналы аминокислот Lys

Отнесение сигналов в спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly сделано в соответствии с литературными данными [21, 22] и на основании двумерных экспериментов ЯМР (HSQC и HMBSC), а также селективного одномерного эксперимента ЯМР TOCSY.

Для примера рассмотрим проведение отнесения сигналов от аминокислоты лизина. На спектре ЯМР ^1H (рис. 2) наблюдается отдельный выделенный триплетный сигнал при 2.94 м.д. Для ответа на вопрос: с какими ядрами водорода взаимодействуют протоны, резонирующие на 2.94 м.д., записан селективный одномерный ЯМР-спектр TOCSY с выделением интересующего сигнала. Полученный спектр (рис. 3) состоит из 5 сигналов различной мультиплетности, что свидетельствует о том, что сигналы соответствуют аминокислоте, радикал которой содержит 5 магнитно неэквивалентных ядер водорода. Под данную характеристику из декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly подходят лишь следующие аминокислоты: лизин, лейцин и изолейцин. Исходя из литературных данных [21, 22], анализа мультиплетности и интегральной интенсивности, сигналы спектра TOCSY (рис. 3) были приписаны лизину. Точно так же было сделано полное соотнесение сигналов ЯМР ^1H всего декапептида. Отнесение сигналов атомов углерода в декапептиде, взаимодействующих с протонами, было получено из двумерного спектра ЯМР HSQC (рис. 4, как пример), используя приписанные протонные химические сдвиги. Сигналы от углеродов карбоксильной группы аминокислотных фрагментов были определены на основе спектров HMBSC (рис. 5, как пример). Это было сделано на основании кросс-пиков, возникающих в результате взаимодействия углеродов с протонами альфа-групп аминокислотных остатков. На рис. 5 наблюдается кросс-пик одного

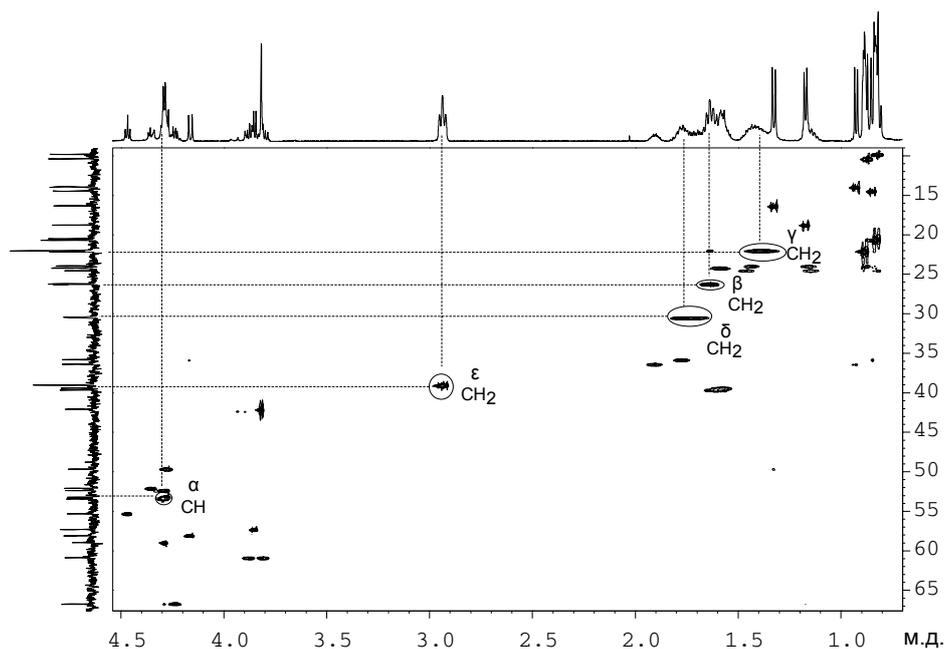


Рис. 4. ЯМР двумерный HSQC (^1H 500 МГц) спектр декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly в растворе D_2O . $T = 298 \text{ K}$, 0 м.д. соответствует сигналу ЯМР ^1H ТМС. Отмечены сигналы аминокислот Lys

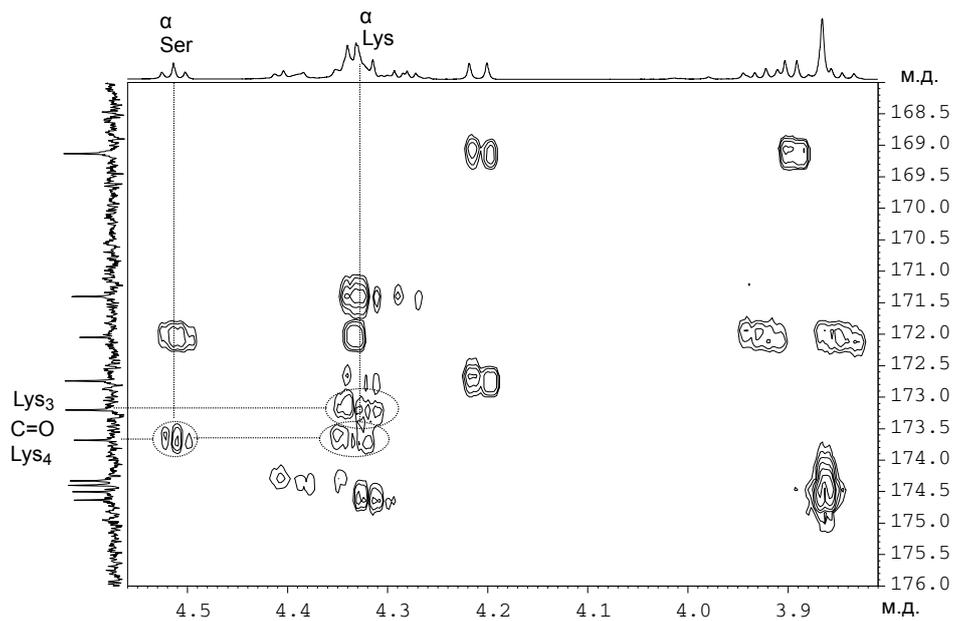


Рис. 5. ЯМР двумерный HMBSC (^1H 500 МГц) спектр декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly в растворе D_2O . $T = 298 \text{ K}$, 0 м.д. соответствует сигналу ЯМР ^1H ТМС

из углеродов (173.7 м.д.) карбоксильной группы аминокислот Lys с альфа-протоном аминокислоты Ser. Вследствие этого данный сигнал приписывается Lys-4, так как он наиболее близко расположен к Ser, а сигнал ЯМР ^{13}C с 173.2 м.д. – карбоксильной группе Lys-3.

ЯМР-спектроскопия позволяет однозначно говорить о пространственном строении декапептида в терминах расположения глициновых фрагментов относительно пептидных связей $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$, поскольку вращение вокруг этих связей сопряжено с преодолением высокого барьера (75–80 кДж/моль [23]), что позволяет в шкале ЯМР наблюдать «вымороженные» спектры транс- и цис- (ориентация $\text{C}(\text{O})$ - и NH -связей) конформеров, как это наблюдается, к примеру, для бензол замещенных триглицинов [24]. Поскольку для исследуемого соединения наблюдаются лишь индивидуальные ЯМР ^1H и ^{13}C спектры в воде, можно сделать вывод, что декапептид Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly, по данным ЯМР-спектроскопии, существует в растворе в виде одного из возможных конформеров.

Для определения межпротонных расстояний, напрямую характеризующих пространственную геометрию декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly в растворе, записывались двумерные ЯМР NOESY спектры с вариацией времени смешивания τ_m . Наблюдать кросс-пики в двумерных ЯМР NOESY спектрах между сигналами протонов исследуемого соединения, относящимся к различным аминокислотным фрагментам, не удалось, что объяснимо отмеченной выше неэффективностью метода NOESY ЯМР-спектроскопии к исследованию строения относительно малых молекул.

С целью определения одного из возможных конформеров декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly были проведены расчеты по методу молекулярной механики по программе DYNAMO [25], которые позволили однозначно определить некий конформер как наиболее выгодную структуру для декапептида.

Для определения пространственного строения декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly использовался описанный выше подход, который основан на анализе величин остаточного диполь-дипольного взаимодействия между магнитными ядрами. Для этого были рассмотрены взаимодействия между ядрами ^{13}C и ^1H , разделенные одной химической связью, в молекуле, растворенной в изотропном растворителе, а также в лиотропной среде (смесь *n*-алкилполи(этилен)гликоль C_{12}E_5 / *n*-гексанола и вода). В табл. 2 и 3 приведены данные о химических сдвигах атомов углерода (δ_{C}) и прямых константах спин-спинового взаимодействия ($^1J_{\text{CH}}$) для декапептида, полученных методом ЯМР ^{13}C спектроскопии в условиях отсутствия радиочастотной развязки от протонов. Величины диполь-дипольного взаимодействия ($^1D_{\text{CH}}$), определенные из разницы наблюдаемой КССВ ($^1J_{\text{CH}} + ^1D_{\text{CH}}$) для магнитных ядер молекул, растворенных в лиотропной жидкокристаллической среде и изотропном растворителе [6], представлены в табл. 4.

Табл. 4

Величины диполь-дипольного взаимодействия (${}^1D_{CH}$) декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly, определенные из разницы наблюдаемой КССВ (${}^1J_{CH} + {}^1D_{CH}$) для магнитных ядер молекул, растворенных в лиотропной жидкокристаллической среде и изотропном растворителе

	α CH Val	β CH Val	γ_1 CH ₃ Val	γ_2 CH ₃ Val	α CH Ile	β CH Ile	γ_1 CH ₂ Ile		
${}^1D_{CH}$, Гц	-3.0	-0.8	-1.7	-3.9	8.7	-7.9	-5.6		
	α CH Lys	β CH ₂ Lys	γ CH ₂ Lys	δ CH ₂ Lys	ϵ CH ₂ Lys	α CH Ser	α CH Thr	β CH Thr	γ CH ₃ Thr
${}^1D_{CH}$, Гц	2.7	-0.8	-7.4	-2.6	-0.6	-7.7	-10.4	1.2	-4.6
	α CH Ala	β CH ₃ Ala	α CH Leu	β CH ₂ Leu	γ CH Leu	δ_1 CH ₃ Leu	δ_2 CH ₃ Leu	α CH ₂ Gly	
${}^1D_{CH}$, Гц	-9.8	9.0	-12.8/ -6.1	-21.9	-10.8	-2.8	-1.1	0.5	

Анализ полученных величин диполь-дипольного взаимодействия (${}^1D_{CH}$) проводили по программе DYNAMO [25]. Программа, исходя из соотношения (1), позволяет связывать значения наблюдаемых величин и расположение межъядерного вектора (химическая связь C–H) относительно внешнего магнитного поля в рамках определенной конформации исследуемой молекулы. Критерием соответствия рассчитанной структуры реальной является линейная корреляция между наблюдаемыми и рассчитанными значениями величин диполь-дипольного взаимодействия с учетом заданного пространственного строения исследуемого соединения.

Использование координат атомов декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly в наиболее выгодной конформации, взятых из программы DYNAMO, и экспериментальных значений диполь-дипольных величин показало отсутствие корреляции между наблюдаемыми и рассчитанными значениями величин (рис. 6).

Расчеты в программе DYNAMO с помощью метода молекулярной динамики, использующие экспериментальные значения величин диполь-дипольного взаимодействия, позволили выбрать единственную структуру (рис. 7), для которой наблюдалось полное соответствие между величинами диполь-дипольного взаимодействия (рис. 8). Координаты атомов пространственной структуры декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly, отвечающих этому соответствию между наблюдаемыми и рассчитанными величинами, можно получить у авторов работы.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 09-03-00077а), ФЦП РНП и Федерального агентства по образованию (ДЗН № 09-18) Министерства образования РФ.

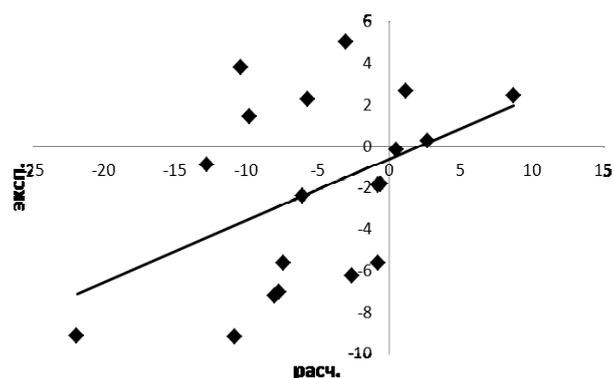


Рис. 6. Зависимость между наблюдаемыми константами диполь-дипольного взаимодействия ($^1D_{CH}$, Гц) для декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly, растворенного в лиотропной жидкокристаллической среде, и рассчитанными значениями соответствующих констант в наиболее выгодной конформации, определенной с помощью программы DYNAMO

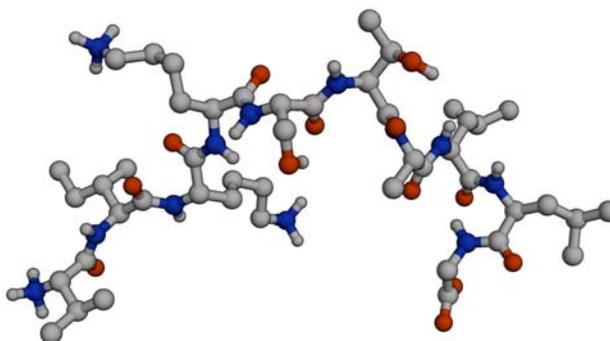


Рис. 7. Конформация декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly, для которой наблюдалось лучшее соответствие между наблюдаемыми и рассчитанными значениями величин диполь-дипольного взаимодействия

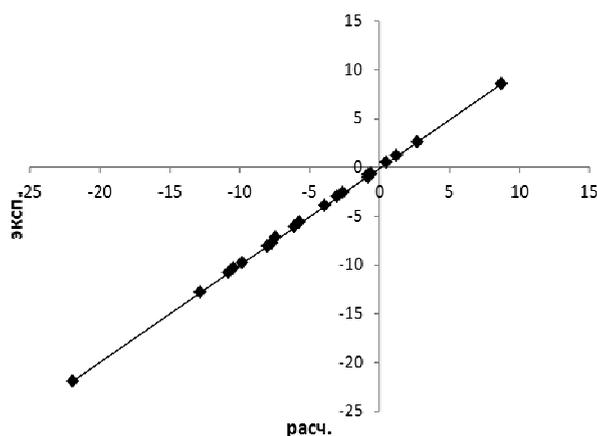


Рис. 8. Зависимость между наблюдаемыми величинами диполь-дипольного взаимодействия ($^1D_{CH}$, Гц) для декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly, растворенного в лиотропной жидкокристаллической среде, и рассчитанными значениями соответствующих величин в конформации, представленной на рис. 7

Summary

D.S. Blochin, S.V. Efimov, A.V. Klochkov, A.R. Yulmetov, A.V. Filippov, V.V. Klochkov. Spatial Structure of Decapeptide Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly Determined by Residual Dipolar Couplings Analysis.

The possibility of determination of relatively small organic compound conformations by the approach based on analysis of the residual dipolar couplings $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ in the molecules partially aligned in lyotropic liquid crystalline media has been considered. This approach has been used in the NMR investigation of decapeptide Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly structure in lyotropic medium (pentaethylene glycol monododecyl ether (C_{12}E_5) / *n*-hexanol); the conformation of decapeptide in solution has been established on the basis of the experimental data of observed dipolar couplings.

Key words: structure, oligopeptides, lyotropic liquid crystalline media, ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy, two-dimensional NMR (TOCSY, HSQC, HMBC, NOESY) spectroscopy.

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. *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.
6. *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.
7. *Thiele C.M., Berger S.* Probing the diastereotopicity of methylene protons in strychnine using residual dipolar couplings // *Org. Lett.* – 2003. – V. 5. – P. 705–708.
8. *Klochkov V.V., Khairutdinov B.I., Klochkov A.V., Shtyrlin V.G., Shaykhtudinov R.A.* A spatial structure of triglycine determined by the residual dipolar couplings analysis // *Appl. Magn. Reson.* – 2003. – V. 25. – P. 113–119.
9. *Klochkov A.V., Khairutdinov B.I., Tagirov M.S., Klochkov V.V.* Determination of the spatial structure of glutathione by residual dipolar coupling analysis // *Magn. Reson. Chem.* – 2005. – V. 43. – P. 948–951.
10. *Ohnishi S., Shortle D.* Observation of residual dipolar couplings in short peptides // *Proteins.* – 2003. – V. 50. – P. 546–551.
11. *Bernado P., Blackledge M.* Anisotropic Small Amplitude Peptide Plane Dynamics in Proteins from Residual Dipolar Couplings // *J. Am. Chem. Soc.* – 2004. – V. 126. – P. 4907–4920.
12. *Ernst R.R., Bodenhausen B., Wokaun A.* Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions. – Oxford: Oxford Univ. Press, 1987. – 610 p.
13. *Van der Ven, Frank J.M.* Multidimensional NMR in liquids: basic principles and experimental methods. – N. Y.; Toronto: Wiley-VCH, 1995. – 399 p.
14. *Berger S., Braun S.* 200 and More NMR Experiments. – Weinheim: Wiley-VCH, 2004. – 810 p.

15. *Ruckert M., Otting G.* Alignment of biological macromolecules in novel nonionic liquid crystalline media for NMR experiments // *J. Am. Chem. Soc.* – 2000. – V. 122. – P. 7793–7797.
16. *Klochkov V.V., Klochkov A.V., Thiele C.M., Berger S.* A novel liquid crystalline system for partial alignment of polar organic molecules // *J. Magn. Reson.* – 2006. – V. 179. – P. 58–63.
17. *Clore G.M., Starich M.R., Gronenborn A.M.* Measurement of Residual Dipolar Couplings of Macromolecules Aligned in the Nematic Phase of a Colloidal Suspension of Rod-Shaped Viruses // *J. Am. Chem. Soc.* – 1998. – V. 120. – P. 10571–10572.
18. *Koenig B.W., Hu J., Ottiger M., Bose S., Hendler R.W., Bax A.* NMR measurement of dipolar couplings in proteins aligned by transient binding to purple membrane fragment // *J. Am. Chem. Soc.* – 1999. – V. 121. – P. 1385–1386.
19. *Prosser R.S., Losonczi J.A., Shiyanovskaya I.V.* Use of a novel aqueous liquid crystalline medium for high-resolution NMR of macromolecules in solution // *J. Am. Chem. Soc.* – 1998. – V. 120. – P. 11010–11011.
20. *Barrientos L.G., Dolan C., Gronenborn, A.M.* Characterisation of surfactant liquid crystal phases suitable for molecular alignment and measurement of residual dipolar couplings // *J. Biomol. NMR.* – 2000. – V. 16. – P. 329–337.
21. *Breitmaier E., Woelter W.* ¹³C NMR spectroscopy. Methods and application in organic chemistry. – Weinheim, N. Y.: Verlag Chemie, 1978. – 322 p.
22. *Wuthrich K.* NMR of Proteins and Nucleic Acids. – N. Y.: Wiley-VCH, 1986. – 396 p.
23. *Oki M.* Application of dynamic NMR spectroscopy to organic chemistry. – N. Y.: VCH Publ., Inc. 1985. – 423 p.
24. *Anishetty S., Pennathur G., Anishetty R.* Tripeptide analysis of protein structures // *BMC Struct. Biol.* – 2002. – V. 2. – P. 1472–1507.
25. *Delaglio F., Grzesiek S., Vuister G., Zhu G., Pfeifer J., Bax A.* NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes // *J. Biomol. NMR.* – 1995. – V. 6. – P. 277–293.

Поступила в редакцию
07.05.10

Блохин Дмитрий Сергеевич – студент физического факультета Казанского (Приволжского) федерального университета.

Ефимов Сергей Владимирович – аспирант кафедры общей физики Казанского (Приволжского) федерального университета.

Клочков Антон Владимирович – кандидат физико-математических наук, ведущий инженер кафедры физики молекулярных систем Казанского (Приволжского) федерального университета.

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

Филиппов Андрей Васильевич – доктор физико-математических наук, профессор кафедры физики молекулярных систем Казанского (Приволжского) федерального университета.

Клочков Владимир Васильевич – доктор химических наук, профессор кафедры общей физики Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: vladimir.klochkov@ksu.ru