

УДК 544.176:539.143.43

**ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ ДИПЕПТИДА γ Glu-Trp,
ОПРЕДЕЛЕННОЕ ПУТЕМ АНАЛИЗА ВЕЛИЧИН
ОСТАТОЧНОГО ДИПОЛЬ-ДИПОЛЬНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ**

*С.В. Ефимов, А.Р. Юльметов, А.В. Клочков, Г.А. Азиатская,
Ф.Р. Мухамадиев, Р.Ф. Байкеев, В.В. Клочков*

Аннотация

В исследовании трехмерной структуры дипептида γ Glu-Trp использован подход, основанный на анализе величины остаточного диполь-дипольного взаимодействия между ядрами ^1H и ^{13}C в молекулах, частично ориентированных в лиотропной жидкокристаллической среде. Определено пространственное строение дипептида.

Ключевые слова: спектроскопия ЯМР ^1H и ^{13}C , остаточное диполь-дипольное взаимодействие, пространственная структура, молекулярная динамика, дипептид.

Введение

Одной из важнейших задач химической и биологической физики является установление пространственного строения органических и биоорганических соединений. Хорошо известно, что биологическая активность протеинов связана с их пространственным строением. Изучение конформаций олигопептидов также важно, так как многие из олигопептидов обладают фармакологическими свойствами, а некоторые короткие пептидные последовательности, синтезируемые клеткой, являются частью иммунной системы живого организма.

Исследование химической и пространственной структуры органических молекул в растворе проводится методами одно- и двумерной ЯМР-спектроскопии (COSY-, HSQC-, NOESY-модификации) [1–5]. Спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера (2D NOESY) позволяет непосредственно определять расстояния между магнитными ядрами в молекулах в растворе (до 5 Å) и тем самым устанавливать пространственную структуру растворенных соединений [1, 2].

В настоящей работе использован подход, основанный на анализе величин остаточного диполь-дипольного взаимодействия между магнитными ядрами ^{13}C и ^1H , разделенных одной химической связью, для определения пространственного строения дипептида γ Glu-Trp. С недавних пор этот подход активно используется при исследовании методом ЯМР биохимических объектов, подпадающих под условие медленного движения ($\omega_0\tau_c \gg 1$, где τ_c – время корреляции, ω_0 – угловая скорость прецессии магнитных ядер) [6, 7]. Его же применение для изучения небольших молекул в растворе менее распространено (см. работы [8–12]), но не менее значимо, поскольку метод 2D NOESY в этой роли

не всегда эффективен [1, 2]. Причиной тому являются малые значения времен корреляции таких молекул в растворе. Последнее приводит к слабоинтенсивным кросс-пикам в спектрах ЯМР NOESY и затрудняет получение количественной информации о межпротонных расстояниях.

Экспериментальная часть

Регистрацию ЯМР ^1H (500 МГц) и ^{13}C (126 МГц) спектров проводили на ЯМР спектрометре высокого разрешения AVANCE II 500 фирмы Bruker. Спектрометр работает в режиме внутренней стабилизации поля по линии резонанса дейтерия (^2H). При записи протонных спектров в изотропном растворителе (тяжелой воде) использовали 90° -импульсы и насыщение сигнала воды либо 30° -импульсы без насыщения сигнала растворителя. Задержки между импульсами составляли 2 с, число накоплений – от 4 до 100, ширина спектра – 11 м.д., число точек – 26832. При записи спектров ЯМР ^{13}C использовали 30° -импульсы и развязку от протонов (WALTZ-16). Задержки между импульсами равнялись 2 с, число накоплений – 19485, ширина спектра – 236.6 м.д., число точек – 65536. При обработке спектра применяли цифровую экспоненциальную фильтрацию с константой 3 Гц. Одномерные спектры регистрировали при стабилизированной температуре 15 $^\circ\text{C}$.

Для определения констант косвенного спин-спинового взаимодействия и остаточного диполь-дипольного взаимодействия были записаны спектры ^{13}C (по одноимпульсной схеме и INEPT+) без развязки от протонов в изотропной и анизотропной среде. Число накоплений составляло от 45939 до 100000, ширина спектра – 200.8–236.6 м.д., 65536 точек.

Для соотношений сигналов ЯМР ^1H и ^{13}C были записаны двумерные спектры COSY, TOCSY [13] (импульсная последовательность MLEV-17, с подавлением сигнала воды по схеме WATERGATE) и гетероядерный (^1H , ^{13}C)-HMQC. Параметры эксперимента COSY: 8 накоплений на каждое приращение t_1 , размер спектра – 2048×256 точек. Ширина спектрального окна – 12.4×10.2 м.д. Параметры эксперимента TOCSY: 256 инкрементов по 20 прохождений на каждый, размер спектра – 4096×256 точек, 10.2×10.2 м.д. Спектр HMQC имел размер 1024×512 , на каждый инкремент приходилось по 8 сканов. Ширина спектрального окна равна 12 м.д. по оси химических сдвигов ^1H , и 230 м.д. – по оси химических сдвигов ^{13}C . Образец поддерживался при температуре 15 $^\circ\text{C}$. Для выбора путей переноса когерентности в экспериментах TOCSY и HMQC использовали импульсы градиента поля, в COSY – фазовый цикл.

Был также записан спектр NOESY с подавлением сигнала воды (8 сканов на инкремент, 4096×256 точек, ширина окна – 10.2 м.д.). Время смешивания составляло $\tau_{\text{mix}} = 0.5$ с.

В качестве ориентирующей среды использовали смесь *n*-додецил-пентаэтиленгликоля (C_{12}E_5) и *n*-гексанола в воде. Для приготовления образца было взято 23 мкл C_{12}E_5 на 650 мкл D_2O (весовое соотношение $\text{C}_{12}\text{E}_5/\text{вода}$ равно 3.08%); мольное соотношение гексанол/ C_{12}E_5 равно 0.96. Данная жидкокристаллическая среда была описана в работах [14, 15].

Образование ламеллярной фазы контролировали визуально, а также наблюдением квадрупольного расщепления сигнала ЯМР дейтерия, входящего в состав растворителя [7].

Результаты и их обсуждение

Если молекулярная система растворена в лиотропной жидкокристаллической системе [6], то из-за соударений 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, которое проявляется в спектрах ЯМР как остаточное диполь-дипольное взаимодействие; при этом уширение сигналов ЯМР не наблюдается [6, 7].

Регистрируемая величина диполь-дипольного взаимодействия может быть выражена следующим образом [7]:

$$D_{IJ}(\theta, \varphi) = D_a^{IJ} \left((3\cos^2\theta - 1) + \frac{3}{2} R \sin^2\theta \cos 2\varphi \right), \quad (1)$$

где

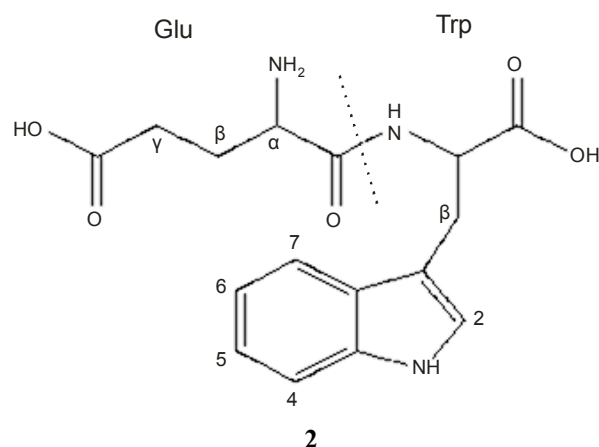
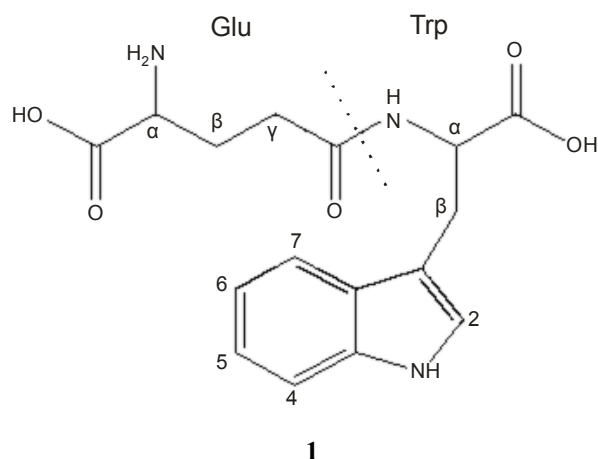
$$D_a^{IJ} = -\frac{\mu_0 h}{16\pi^3} S \gamma_I \gamma_J A_a \langle r_{IJ}^{-3} \rangle. \quad (2)$$

Тензор **A** характеризует преимущественное пространственное расположение молекул относительно внешнего магнитного поля. $R = (A_{xx} - A_{yy})/A_{zz}$ – ромбическая компонента, $A_a = A_{zz} - (A_{xx} + A_{yy})/2$ – аксиальная компонента тензора **A**. A_{xx} , A_{yy} , A_{zz} – проекции молекулярного тензора на оси ортогональной системы координат, связанной с молекулой. S – параметр порядка, описывающий внутреннюю динамическую подвижность межъядерного вектора; θ и φ – его полярные координаты; r_{IJ} – расстояние между ядрами I и J; γ_I и γ_J – гиромагнитные отношения ядер I и J.

Для частичного ориентирования биологических молекул в магнитном поле созданы разнообразные жидкокристаллические среды. В качестве примера можно привести фосфолипидные бицеллы [6], палочковидные вирусы [16] или фрагменты мембран [17]. Нематические фазы могут быть созданы на основе смесей бромида *n*-цетил-*n,n,n*-триметиламмония, хлорида или бромида цетилпиридиния и *n*-гексанола [14, 18]; *n*-алкил-полиэтиленгликолей и нормальных спиртов в воде [14, 15].

Описанный выше подход был использован при определении структуры дипептида γ Glu-Trp (**1**) в растворе, который является основной составляющей лекарственного средства, улучшающего работу иммунной системы [19].

Ранее [20] подобный подход был использован при определении структуры дипептида Glu-Trp (**2**) в растворе, который отличается от дипептида (**1**) не только местоположением химической связи, их соединяющих, но и физико-химическими свойствами.



Для определения межпротонных расстояний, напрямую характеризующих пространственную геометрию дипептида (**1**) в растворе, использовалась двумерная ЯМР NOESY-спектроскопия. К сожалению, нам не удалось обнаружить кросс-пики в спектрах NOESY между протонами, относящимися к разным аминокислотным остаткам. Это, на наш взгляд, вызвано удаленностью друг от друга протонов при α - и β -углеродных атомах, принадлежащих различным аминокислотным остаткам, а также обсуждаемой выше неэффективностью метода двумерной ЯМР NOESY-спектроскопии к исследованию строения относительно малых молекул.

Для выяснения пространственного строения дипептида γ Glu-Trp использовался описанный выше подход, основанный на анализе величин диполь-дипольного взаимодействия между магнитными ядрами. Для этого были рассмотрены взаимодействия между ядрами ^{13}C и ^1H , разделенными одной химической связью, в молекуле, растворенной в изотропном растворителе и лиотропной среде (смесь *n*-алкил-полиэтиленгликоля C_{12}E_5 / *n*-гексанола и воды). В табл. 1 приведены данные о химических сдвигах атомов углерода (δ_{C}) и прямых констант спин-спинового взаимодействия ($^1J_{\text{CH}}$) для дипептида, полученных методом ЯМР ^{13}C спектроскопии в отсутствие радиочастотной развязки от протонов. Величины остаточного диполь-дипольного взаимодействия ($^1D_{\text{CH}}$), определенные из разницы

Табл. 1

Химические сдвиги ЯМР ^{13}C атомов углерода (δ_{C} , м.д., относительно ТМС) и значения прямых констант спин-спинового взаимодействия ($^1J_{\text{CH}} + ^1D_{\text{CH}}$, Гц) для дипептида $\gamma\text{Glu-Trp}$, растворенного в изотропном растворителе и лиотропной ЖК-среде

Атом углерода	Химические сдвиги ^{13}C , м.д.	$^1J_{\text{CH}}$, Гц	$^1J_{\text{CH}} + ^1D_{\text{CH}}$, Гц
$\alpha\text{CH Glu}$	54.0	148	153
$\beta\text{CH}_2 \text{ Glu}$	26.2	137	99
$\gamma\text{CH}_2 \text{ Glu}$	31.7	126	105
		132	111
$\alpha\text{CH Trp}$	55.8	139	101
$\beta\text{CH}_2 \text{ Trp}$	27.4	129	85

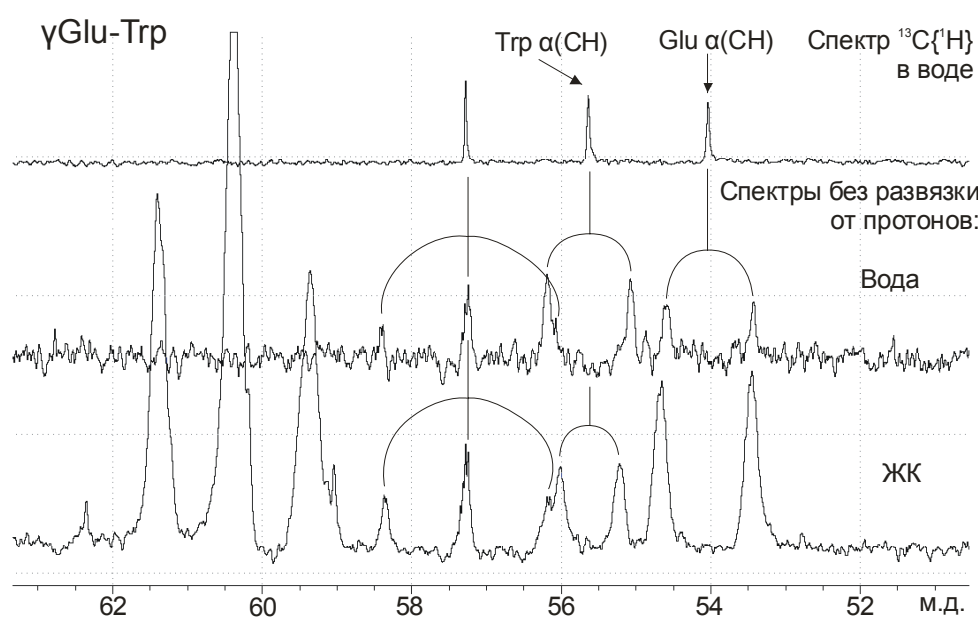


Рис. 1. Участки спектров ЯМР ^{13}C (без развязки от протонов) дипептида (**1**), записанные в разных условиях. Сигнал на 57.3 м.д. – примесь, триплет с химическим сдвигом 60.4 м.д. в нижнем спектре – сигнал от ядер ^{13}C компонентов лиотропной ЖК-среды

наблюдаемой константы спин-спинового взаимодействия ($^1J_{\text{CH}} + ^1D_{\text{CH}}$) для магнитных ядер молекул, растворенных в лиотропной жидкокристаллической (ЖК) среде и изотропном растворителе [7], оказались следующими: 5.0 Гц для $\alpha\text{CH Glu}$, -38.0 Гц для одного из протонов группы $\beta\text{CH}_2 \text{ Glu}$, -21.0 Гц для $\gamma\text{CH}_2 \text{ Glu}$; -38.0 Гц для $\alpha\text{CH Trp}$, -44.0 Гц для $\beta\text{CH}_2 \text{ Trp}$. На рис. 1 представлены участки спектров, отвечающие резонансам атомов углерода в α -позициях, записанных с подавлением спин-спинового взаимодействия с протонами, а также без подавления (в воде и ЖК-среде).

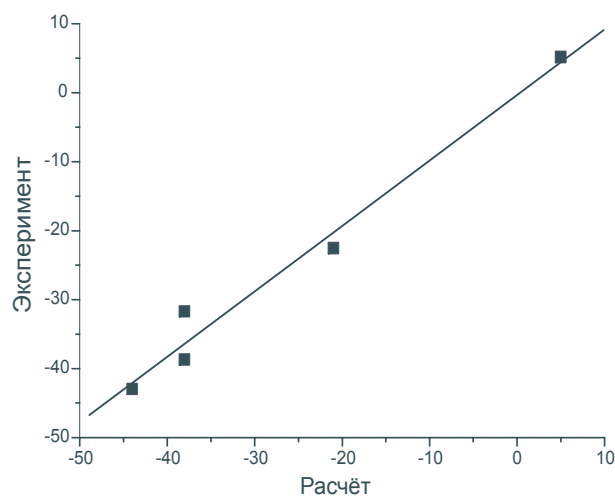


Рис. 2. Соотношение экспериментальных и рассчитанных констант остаточного диполь-дипольного взаимодействия для дипептида (1), смоделированного по априорным данным

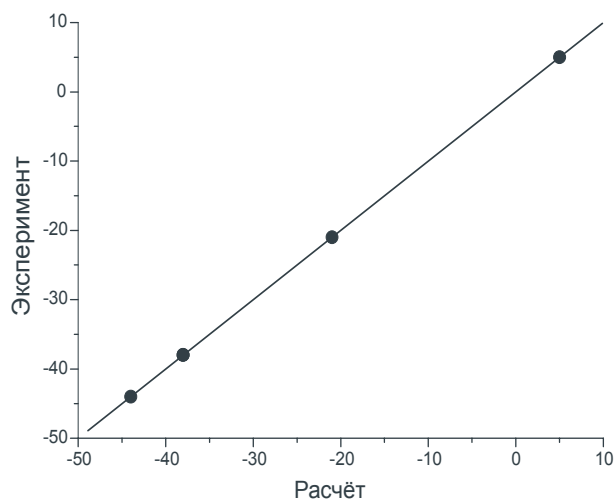


Рис. 3. Соответствие экспериментальных и рассчитанных констант остаточного диполь-дипольного взаимодействия для дипептида (1), смоделированного с учетом величин $^1D_{CH}$

Программа для молекулярного моделирования DYNAMO, входящая в пакет NMRPipe [21], использует экспериментально полученные ограничения на структуру молекулы для составления псевдопотенциала вида

$$E_{\text{tot}} = E_{\text{bond}} + E_{\text{angle}} + E_{\text{impr}} + E_{\text{vdw}} + E_{\text{noe}} + E_{\text{jcoupl}} + E_{\text{torsion}} + E_{\text{dipo}} + E_{\text{pcs}} + E_{\text{rgyr}}, \quad (3)$$

куда входят также априорные данные о длинах валентных связей, типичных углах между связями и т. д. Моделирование ведется методом симулированного отжига (simulated annealing): сначала системе атомов приписывается большая энергия (большая температура), затем она постепенно уменьшается; атомы в конечном итоге занимают положение, обеспечивающее минимум целевой функции (3).

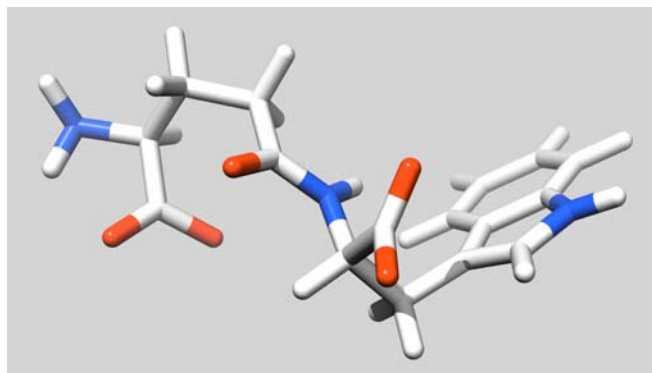


Рис. 4. Пространственное строение дипептида (1), полученное в результате моделирования с привлечением констант остаточного диполь-дипольного взаимодействия

С использованием программы DYNAMO были проведены расчеты трехмерной структуры строения дипептида (1). Случайным образом сгенерированная структура подвергалась оптимизации только по априорным данным, а затем полученная таким образом структура еще раз подвергалась симулированному отжигу, но уже с применением констант остаточного диполь-дипольного взаимодействия (RDC; слагаемое E_{dipo} в (3)). Далее с помощью программы MODULE [22] проверялось, насколько полученная конформация соответствует экспериментальным значениям RDC.

Соответствие структуры, рассчитанной только по априорным данным, экспериментальным константам не идеально (рис. 2). После включения в расчет величин $^1D_{\text{CH}}$ корреляция экспериментальных и рассчитанных в MODULE констант улучшилась (все точки ложатся на одну прямую – рис. 3).

Изображение молекулы (рис. 4) подготовлено с помощью программы UCSF Chimera (Калифорнийский университет, проект NIH P41 RR-01081 [23]). Координаты атомов в смоделированной структуре можно получить у авторов публикации.

Summary

S.V. Efimov, A.R. Yulmetov, A.V. Klochkov, G.A. Aziatskaya, F.R. Mukhamadiev, R.F. Baikееv, V.V. Klochkov. Spatial Structure of Dipeptide $\gamma\text{Glu-Trp}$ as Determined by Residual Dipolar Couplings Analysis.

An approach based on analysis of the residual ^1H and ^{13}C dipolar couplings in molecules partially aligned in a lyotropic liquid crystalline medium was used to study three-dimensional structure of dipeptide $\gamma\text{Glu-Trp}$. Spatial structure of the dipeptide was determined.

Key words: ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy, residual dipolar coupling, spatial structure, molecular dynamics, dipeptide.

Литература

1. Ernst R.R., Bodenhausen B., Wokaun A. Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions. – Oxford: Oxford Univ. Press, 1987. – 610 p.
2. Van der Ven, Frank J.M. Multidimensional NMR in liquids: basic principles and experimental methods. – N. Y.; Toronto: Wiley-VCH, 1995. – 399 p.

3. Dynamic Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy / Eds. L.M. Jackman, F.A. Cotton. – N. Y.; San Francisco: London: Acad. Press, 1975. – 660 p.
4. *Sandstrom J.* Dynamic NMR Spectroscopy. – London: Acad. Press, 1982. – 226 p.
5. *Oki M.* Application of dynamic NMR spectroscopy to organic chemistry. – N. Y.: VCH Publ., Inc. – 1985. – 423 p.
6. *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.
7. *Alba E., Tjandra N.* NMR dipolar couplings for the structure determination of biopolymers in solution // *Progr. NMR Spectrosc.* – 2002. – V. 40. – P. 175–197.
8. *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.
9. *Klochkov V.V., Khairutdinov B.I., Klochkov A.V., Shtyrin V.G., Shaykhutdinov R.A.* Spatial Structure of Triglycine Determined by the Residual Dipolar Couplings Analysis // *Appl. Magn. Reson.* – 2003. – V. 25. – P. 113–119.
10. *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, No 11. – P. 948–951.
11. *Ohnishi S., Shortle D.* Observation of residual dipolar couplings in short peptides // *Proteins*. – 2003. – V. 50. – P. 546–551.
12. *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.
13. *Berger S., Braun S.* 200 and More NMR Experiments. – Weinheim: Wiley-VCH, 2004. – 810 p.
14. *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.
15. *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, No 1. – P. 58–63.
16. *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.
17. *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.
18. *Prosser R.S., Losonczi J.A., Shiyankovskaya 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.
19. *Петров А.В., Пугарева Н.В., Котов А.Ю., Колобов А.А., Симбирцев А.С.* Изучение влияния Бестима (SCV-07) на дифференцировку Т-лимфоцитов у мышей // *Цитокнины и воспаление*. – 2007. – Т. 6, Вып. 3. – С. 27–31.
20. *Klochkov V.V., Baikiev R.F., Skirda V.D., Klochkov A.V., Muhamadiev F.R., Baskyr I., Berger S.* Spatial structure of peptides determined by residual dipolar couplings analysis // *Magn. Reson. Chem.* – 2009. – V. 47. – P. 57–62.
21. *Delaglio F., Grzesiek S., Vuister G.W., Zhu G., Pfeifer J., Bax A.* NMRpipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes // *J. Biomol. NMR*. – 1995. – V. 6, No 3. – P. 277–293.

22. *Dosset P., Hus J.C., Marion D., Blackledge M.* A novel interactive tool for rigid-body modeling of multi-domain macromolecules using residual dipolar couplings // *J. Biomol. NMR.* – 2001. – V. 20. – P. 223–233.
23. *Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E.* UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis // *J. Comput. Chem.* – 2004. – V. 25, No 13. – P. 1605–1612.

Поступила в редакцию
10.06.10

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

E-mail: *Sergej.Efimov@ksu.ru*

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

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

Азиатская Гузель Анваровна – студент кафедры биохимии Казанского государственного медицинского университета.

Мухамадиев Фархат Рифатович – лаборант кафедры биохимии Казанского государственного медицинского университета.

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

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

E-mail: *Vladimir.Klochkov@ksu.ru*