

Ефимов Сергей Владимирович

**ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ
АКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ В РАСТВОРАХ И В КОМПЛЕКСЕ С
МОДЕЛЬНОЙ МЕМБРАНОЙ ПО ДАННЫМ ДВУМЕРНЫХ
МЕТОДОВ СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР**

01.04.07 – Физика конденсированного состояния

Автореферат диссертации на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук

Казань – 2013

Работа выполнена на кафедре общей физики и в лаборатории ЯМР Института
физики Казанского (Приволжского) федерального университета

Научный руководитель: доктор химических наук,
профессор Клочков Владимир Васильевич

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук,
профессор, заведующий кафедрой физики
молекулярных систем Института физики КФУ
Скирда Владимир Дмитриевич

доктор химических наук, профессор,
заведующий лабораторией биофизической
химии наносистем КИББ КазНЦ РАН
Зуев Юрий Фёдорович

Ведущая организация: Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова

Защита состоится «21» июня 2013 года в 17:00 на заседании диссертационного
совета Д 212.081.15 при Казанском (Приволжском) федеральном университете
по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлёвская, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке
им. Н.И. Лобачевского Казанского федерального университета.

Автореферат разослан «20» мая 2013 года.

Учёный секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук,
профессор



М.В. Еремин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Известно, что физико-химические свойства органических и биоорганических веществ, характер внутри- и межмолекулярных взаимодействий зависят от пространственного строения молекул. Установление пространственной структуры молекул, изучение их подвижности в широком диапазоне времён корреляции молекулярного движения, определение параметров взаимодействия с другими молекулами (образования комплексов) являются первостепенными задачами химической и биологической физики.

Спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО, в английском варианте – nuclear Overhauser effect spectroscopy, NOESY) является одним из эффективных методов получения структурной информации. Этот метод ограниченно применим к молекулам, удовлетворяющим условию быстрого движения ($\omega_0 \cdot \tau_c \ll 1$, где ω_0 – частота ларморовой прецессии, τ_c – время корреляции молекулярного движения), и удобен при изучении молекул и молекулярных образований (комплексов), подпадающих под условие медленного движения ($\omega_0 \cdot \tau_c \gg 1$). В случае неэффективности данного подхода применяют альтернативные методы ЯМР, например, спектроскопию ЯЭО во вращающейся системе координат, релаксационные измерения, анализ величин остаточного диполь-дипольного взаимодействия (ОДДВ, в английском варианте – residual dipolar coupling, RDC).

При связывании молекул малой молекулярной массы (например, олигопептида) с мицеллами на основе поверхностно-активного вещества образуется комплекс, молекулярная масса которого значительно превосходит массу несвязанной молекулы. С точки зрения методических аспектов ЯМР, исследуемое низкомолекулярное соединение переходит из разряда малых молекул (условие быстрого движения) в разряд молекул, подпадающих под условие медленного движения. Таким образом, спектроскопия ЯМР NOESY может быть использована при решении структурных задач для небольших по количеству аминокислотных остатков пептидов.

Целью работы являлось определение пространственной структуры (координат атомов в формате PDB) биологически активных пептидов методами одно- и двумерной спектроскопии ЯМР (NOESY, TOCSY и др.), а также с использованием подхода, основанного на анализе величин остаточного диполь-дипольного взаимодействия.

Для установления пространственного строения соединений, время корреляции молекулярного движения которых в растворе соответствует режиму быстрого движения ($\omega_0 \cdot \tau_c \ll 1$), решалась задача повышения эффективности метода двумерной спектроскопии ЯМР NOESY, достигаемого за счёт образования комплекса изучаемых молекул с тяжёлыми надмолекулярными образованиями – мицеллами поверхностно-активного вещества.

Задачей исследования также являлось установление конформационного состава и определение термодинамических параметров конформационного

обмена для циклоспорина, находящегося в состоянии равновесия нескольких конформеров.

Объекты исследования. В работе проведены исследования следующих пептидов: дипептида γ Glu-Trp, трипептида Gly-Gly-His, декапептида с аминокислотной последовательностью Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly и циклоспорина А *цикло(-Bmt-Abu-Sar-Mle-Val-Mle-Ala-DAla-Mle-Mle-Mva-)* (краткое обозначение CsA). Дипептид гамма-глутамил-триптофан и циклоспорин представляют собой активные компоненты лекарственных препаратов. Так, дипептид проявляет антибактериальную и противовоспалительную активность, циклоспорин CsA подавляет отторжение пересаженных тканей. Трипептид и декапептид служили модельными объектами для отработки методов спектроскопии ЯМР молекул малой молекулярной массы в растворах и в комплексе с модельными мембранами.

Научная новизна состоит в следующем:

Показана принципиальная возможность использования двумерной спектроскопии ЯМР NOESY для определения внутримолекулярных межпротонных расстояний в соединениях, подпадающих под условие быстрого движения, при образовании комплекса этих соединений с тяжёлыми надмолекулярными образованиями – мицеллами поверхностно-активного вещества (анионным ПАВ – додецилсульфатом натрия, ДСН). Данный подход впервые был опробован при исследовании методами спектроскопии ЯМР трипептида Gly-Gly-His и декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly в водных растворах, содержащих мицеллы ДСН. Методом двумерной спектроскопии ЯМР NOESY определены координаты атомов (в формате PDB) декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly в комплексе олигопептид – модель мембраны (мицеллы на основе додецилсульфата натрия).

Анализом величин остаточного диполь-дипольного взаимодействия $^1D(C,H)$ впервые определено пространственное строение дипептида γ Glu-Trp и циклоспорина CsA. Дипептид γ Glu-Trp исследован в растворе лиотропной жидкокристаллической системы на основе *n*-алкил-полиэтиленгликоля (C12E5), гексанола и воды. Впервые получены величины гетероядерного остаточного диполь-дипольного взаимодействия $^1D(C,H)$ для циклоспорина CsA, растворённого в анизотропной среде – деформированном геле из полистирола, набухшего в хлороформе. На основании величин $^1D(C,H)$ было установлено пространственное строение преимущественной конформации циклоспорина в этой среде.

На основании данных о межпротонных расстояниях (спектроскопия ЯМР NOESY) в совокупности с расчётом методом молекулярной динамики (программа XPLOR-NIH) впервые установлена пространственная структура циклоспорина CsA в комплексе с мицеллой на основе поверхностно-активного вещества – додецилсульфата натрия. Проведено сравнение структур, существующих в неполярных органических средах и в комплексе с мицеллами в растворе.

Анализом одно- и двумерных спектров ЯМР (модификации COSY, TOCSY, NOESY) впервые установлен конформационный состав циклоспорина CsA и определены термодинамические параметры конформационного равновесия в растворе хлороформа. Определённая экспериментально разница свободных энергий конформеров, свободная энергия активации, а также картина изменения химических сдвигов в минорном конформере по сравнению с преимущественным позволили описать пространственное строение минорного конформера.

Научная и практическая значимость.

Продемонстрированная возможность использования двумерной спектроскопии ЯМР NOESY для соединений, подпадающих под условие быстрого движения, существующих в комплексе с тяжёлыми надмолекулярными образованиями – мицеллами поверхностно-активного вещества, – приводит к более информативным двумерным спектрам ЯМР NOESY, что, в свою очередь, позволяет получать количественную информацию о межпротонных расстояниях в таких соединениях.

Координаты атомов (в формате PDB), входящих в состав изученных олигопептидов (дипептида γ Glu-Trp, циклоспорина *цикло*(-Bmt-Abu-Sar-Mle-Val-Mle-Ala-DAla-Mle-Mle-Mva-)), определённые путём анализа экспериментальных значений $^1D(C,H)$ и спектров ЯМР NOESY, могут быть использованы при сравнении с координатами атомов аналогичных аминокислотных последовательностей (в частном случае – фрагментов цепей полипептидов).

Данные о пространственном строении циклоспорина CsA в связанном с модельной мембраной состоянии позволяют строить обоснованные модели того, как молекула циклоспорина может размещаться в клеточной мембране и взаимодействовать с другими молекулами, такими, как интегральные белки.

Описание пространственного строения минорного конформера циклоспорина даёт представление о нежёстком участке пептидной цепи, и эта информация может быть полезна при анализе взаимодействий циклоспорина CsA с другими молекулами.

Обоснованность и достоверность результатов подтверждается взаимным соответствием данных спектроскопии ЯЭО (NOESY) и анализа величин остаточного диполь-дипольного взаимодействия (в случае, когда были одновременно получены оба типа данных); согласием измеренной свободной энергии активации и скорости обмена для циклоспорина в хлороформе с литературными данными о типичных параметрах для *цис-транс* изомеризации пептидов; использованием современного оборудования и программных средств.

Личный вклад автора: регистрация одно- и двумерных спектров ЯМР, создание вспомогательных программных средств для анализа спектров, написание статей по теме проведённых исследований. Автору принадлежат результаты интерпретации спектров ЯМР (информация о геометрии исследованных соединений) и результаты компьютерного моделирования молекулярных структур.

На защиту выносятся положения, сформулированные в выводах.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на следующих конференциях: XII и XV Молодёжных школах «Актуальные проблемы магнитного резонанса и его приложения» (Казань, 2009, 2012), Международном симпозиуме и летней школе «ЯМР в конденсированных средах» (Санкт-Петербург, 2010), Всероссийской молодёжной школе «Магнитный резонанс в химической и биологической физике» (Новосибирск, 2010), 7 Зимней молодёжной школе-конференции «Магнитный резонанс и его приложения» (Санкт-Петербург, 2010), V Всероссийской конференции «Новые достижения ЯМР в структурных исследованиях» (Казань, 2011), X и XI Научных конференциях молодых учёных, аспирантов и студентов НОЦ КФУ «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2011, 2012), Молодёжной школе «Магнитный резонанс и магнитные явления в химической и биологической физике» (Новосибирск, 2012).

Диссертационная работа выполнена в лаборатории ЯМР Института физики КФУ и, частично, в Институте аналитической химии Лейпцигского университета. Исследования были поддержаны Министерством образования и науки Российской Федерации (ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг.), Министерством образования и науки Республики Татарстан (совместная программа МОиН РТ / DAAD «Алгарыш», программа «Евгений Завойский»), грантом РФФИ 09-03-00077_а. Часть работы выполнена в рамках работы ФЦКП ФХИ в Казанском (Приволжском) федеральном университете и научно-образовательного центра «Биомедицинская радиоспектроскопия и оптика».

Публикации. По теме диссертации опубликовано 16 работ, из них 7 статей в рецензируемых журналах и 9 работ в сборниках трудов и тезисов вышеперечисленных конференций различного уровня.

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения, четырёх глав, заключения, приложения, списка цитируемой литературы из 120 наименований и списка публикаций автора. Работа изложена на 133 страницах.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность диссертационной работы, обозначены объекты и цели исследования, научная новизна и практическая значимость полученных результатов, а также описана структура диссертации.

В первой главе изложены основные положения спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и, в частности, теория эксперимента NOESY и альтернативных подходов спектроскопии ЯМР, используемых при изучении структуры органических и биоорганических соединений в растворах. Рассмотрены специфика спектроскопии ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) в случаях молекул различной подвижности (с короткими и длинными временами корреляции); приведены примеры исследований лигандов в комплексе с

протеинами или модельными мембранами. Как альтернативный источник структурных данных рассматривается анализ взаимодействий, проявляющихся в анизотропных средах, в частности, остаточного диполь-дипольного взаимодействия магнитных ядер.

Во второй главе приведены результаты одно- и двумерных ЯМР экспериментов по исследованию пептидов (дипептида γ Glu-Trp, трипептида Gly-Gly-His, декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly и циклоспорина *цикло*(-Bmt-Abu-Sar-Mle-Val-Mle-Ala-DAla-Mle-Mle-Mva-)), подпадающих под условие быстрого движения. Здесь же обсуждаются результаты экспериментов, проведённых в анизотропных средах.

Исследования пространственного строения органических соединений в растворах основаны на использовании современных подходов в спектроскопии ЯМР, таких, как двумерная спектроскопия (эксперименты COSY, TOCSY, HSQC, HMBC и NOESY). Эксперимент NOESY позволяет определять расстояния между магнитными ядрами, отстоящими друг от друга на расстояние до 5 Å и, тем самым, устанавливать пространственную структуру органических соединений в растворе. Как отмечалось выше, применение метода двумерной спектроскопии ЯМР NOESY к малым молекулам, подпадающим под условие быстрого движения ($\omega_0 \cdot \tau_c \ll 1$), не всегда эффективно. Это обусловлено малыми временами корреляции τ_c таких молекул в растворе, что приводит к слабоинтенсивным кросс-пикам в спектрах NOESY и затрудняет получение количественной информации о межпротонных расстояниях в таких молекулярных системах.

Альтернативным методом получения информации о пространственном строении органических соединений в растворах является анализ величин остаточного диполь-дипольного взаимодействия (в дальнейшем – RDC) между магнитными ядрами, входящими в состав молекул. Если движение молекулы ограничено присутствующими в растворе надмолекулярными образованиями (ламеллами лиотропной жидкокристаллической среды, палочковидными вирусными частицами и др.), то поступательное и вращательное движение молекул становится анизотропным в результате взаимодействия с магнитно-ориентированными молекулярными образованиями. Это, в свою очередь, приводит к тому, что диполь-дипольное взаимодействие не усредняется полностью (остаточное диполь-дипольное взаимодействие) и проявляется в спектрах ЯМР в виде расщепления сигнала. Уширение сигналов ЯМР при этом несущественно. Известно, что величина диполь-дипольного взаимодействия может быть выражена следующим образом:

$$D_{IS} = \frac{-\mu_0 \hbar}{8\pi^2} S \gamma_I \gamma_S \langle r_{IS}^{-3} \rangle \left(\mathbf{A}_a (3 \cos^2 \theta - 1) + \frac{3}{2} \mathbf{A}_r \sin^2 \theta \cos 2\varphi \right),$$

где углы θ и φ – полярные координаты вектора, соединяющего ядра I и S; \mathbf{A}_a и \mathbf{A}_r – компоненты тензора, определяющего наиболее вероятную ориентацию

Таблица 1. Химические сдвиги ЯМР ^{13}C атомов углерода (δ_{C} , м. д., относительно ТМС) и прямые константы спин-спинового взаимодействия ($^1J(\text{C,H}) + ^1D(\text{C,H})$, Гц) для дипептида $\gamma\text{Glu-Trp}$, растворённого в изотропном растворителе и лиотропной жидкокристаллической среде.

Атом углерода	Химические сдвиги ^{13}C , м. д.	$^1J(\text{C,H})$, Гц	$^1J(\text{C,H}) + ^1D(\text{C,H})$, 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

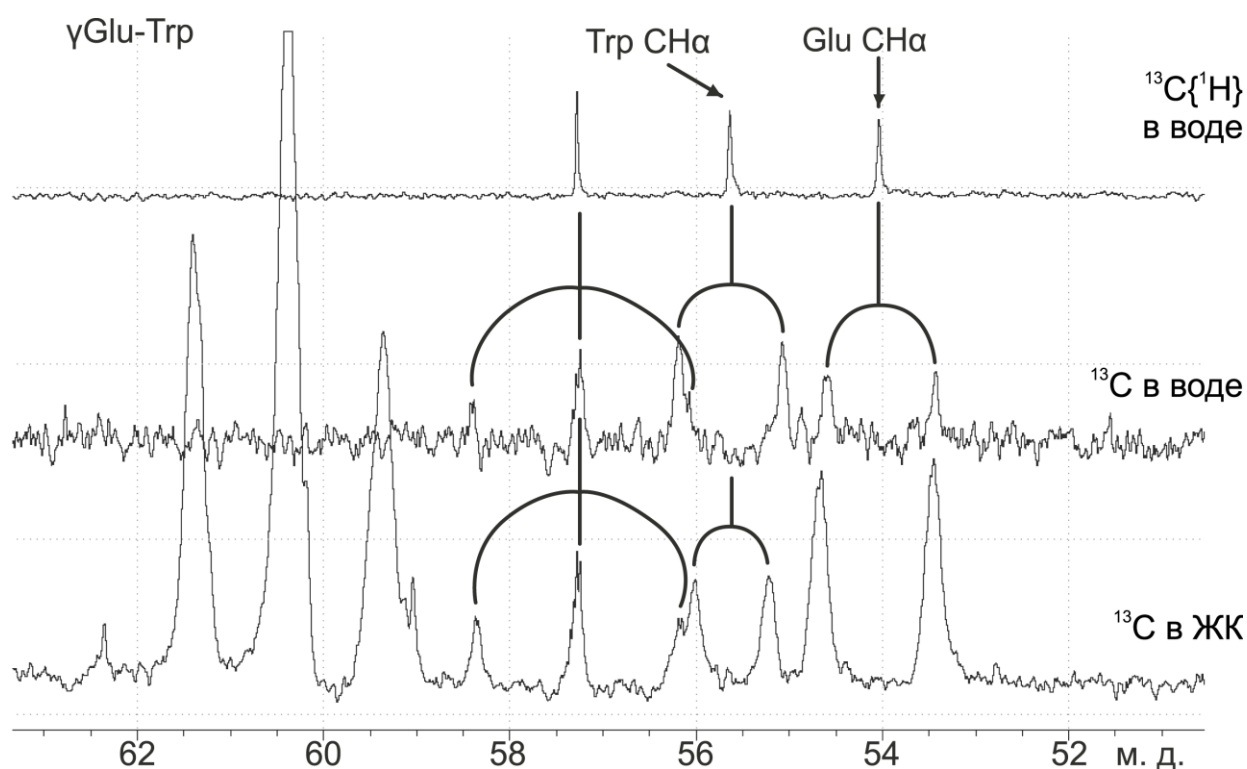


Рис. 2. Спектры ЯМР ^{13}C дипептида $\gamma\text{Glu-Trp}$ в изотропной и анизотропной средах и схема измерения величин RDC. (Bruker Avance II 500, 125,76 МГц.)

На рис. 3 показаны соотношения расчётных и измеренных величин $^1D_{(\text{расч.})} - ^1D_{(\text{эксп.})}$ для структур, рассчитанных в программе молекулярного моделирования DYNAMO двумя способами: (1) с учётом полученных экспериментально величин $^1D_{(\text{эксп.})}$ и (2) только по априорным данным о длинах связей и валентных углах в пептидах. Как видно из графика (рис. 3), модель второго типа не удовлетворяет наблюдаемому диполь-дипольному взаимодействию. Рассчитанные структуры приведены на рис. 4.

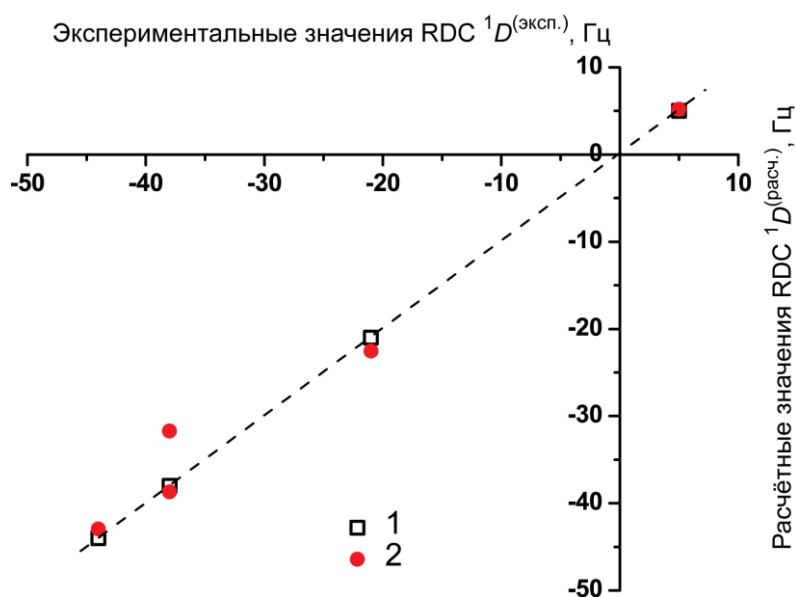


Рис. 3. Корреляция экспериментальных и рассчитанных величин RDC для структур, полученных методом молекулярной динамики (1) с учётом и (2) без учёта измеренных значений $^1D(C,H)$.

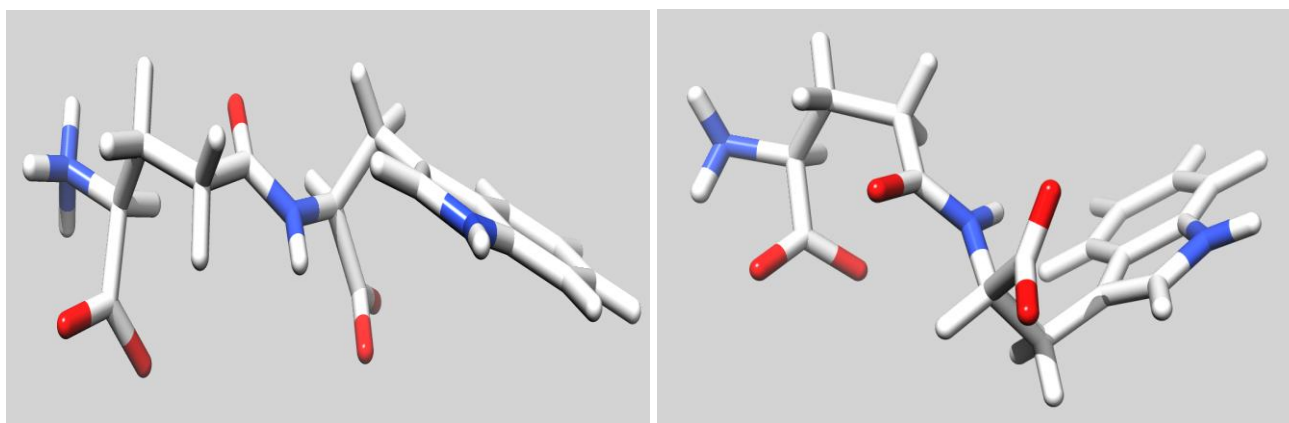


Рис. 4. Структуры молекулы γ Glu-Trp, рассчитанные без учёта (слева) и с учётом величин RDC (справа). Координаты атомов (PDB) приведены в Приложении к диссертации.

Молекулы трипептида Gly-Gly-His (рис. 5) и декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly были исследованы в водных растворах. Отнесение сигналов в спектрах ЯМР 1H и ^{13}C было выполнено, исходя из результатов двумерных корреляционных экспериментов (TOCSY, HSQC). Пространственное строение этих пептидов было определено (совместно с Ключковым А.В. и Блохиным Д.С.) анализом величин остаточного диполь-дипольного взаимодействия (RDC) в анизотропной среде на основе пентаэтиленгликоля (C12E5) в смеси с гексанолом и водой. Эти эксперименты служили отправным пунктом для последующих исследований с модельной мембраной.

Циклоспорин CsA (рис. 6) был исследован в различных растворителях: бензоле, хлороформе, диметилсульфоксиде (ДМСО), воде. Вид спектров ЯМР 1H в неполярных (бензол, хлороформ) и полярных (ДМСО, вода) средах

существенно различается (рис. 7). Так, спектр ЯМР ^1H раствора циклоспорина в ДМСО имеет сложный вид из-за перекрывания многочисленных сигналов, что может свидетельствовать об одновременном существовании в растворе нескольких конформеров этого соединения.

Таблица 2. Химические сдвиги атомов глицил-глицил-гистидина в воде при 291 К; сигнал ЯМР ^1H His(NH δ 1) наблюдался при пониженной температуре (285 К).

Группа	$\delta(^1\text{H})$, м.д.	$\delta(^{13}\text{C})$, м.д.	Группа	$\delta(^1\text{H})$, м.д.	$\delta(^{13}\text{C})$, м.д.
Gly-1 NH ₂	~ 7,9	—	His-3 CH α	4,51	52,2
Gly-1 CH ₂ α	3,69	40,3	His-3 C'	—	173,7
Gly-1 C'	—	167,6	His-3 CH ₂ β	2,98; 3,14	26,3
Gly-2 NH	8,41	—	His-3 C γ	—	128,7
Gly-2 CH ₂ α	3,79	42,0	His-3 NH δ 1	> 10*	—
Gly-2 C'	—	170,7	His-3 CH δ 2	7,09	117,0
His-3 NH	8,28	—	His-3 CH ϵ 1	8,40	133,3

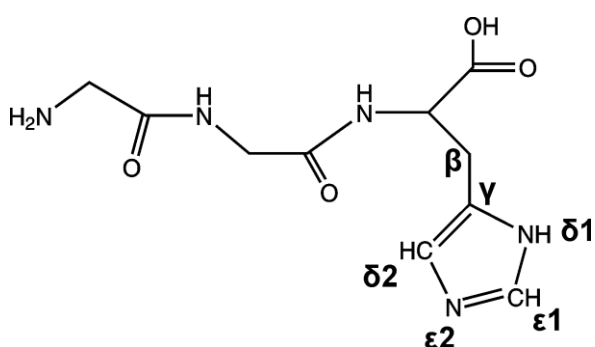


Рис. 5. Химическая структура трипептида Gly-Gly-His.

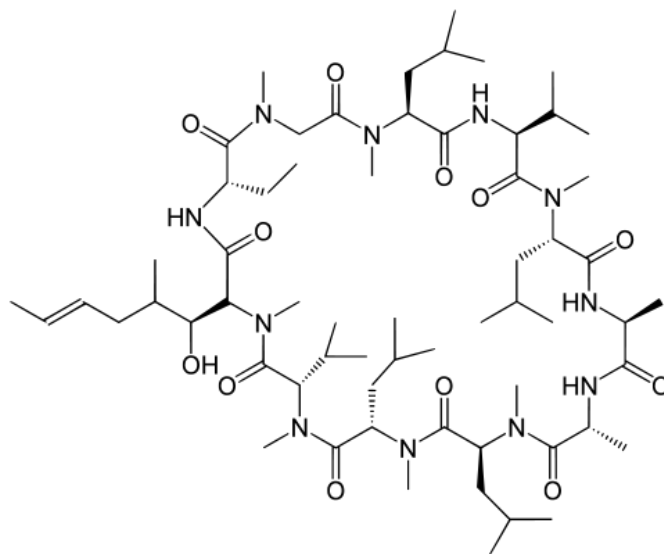


Рис. 6. Химическая структура циклоспорина CsA.

Были зарегистрированы одномерные спектры ЯМР ^1H раствора циклоспорина CsA в воде, в которых четыре амидных (NH) протона молекулы CsA представлены не индивидуальными сигналами, а четырьмя группами сигналов, что также свидетельствует о конформационной неоднородности циклоспорина.

С учётом наблюдаемых особенностей поведения молекулы циклоспорина в различных средах, возникли задачи определения пространственной структуры молекулы CsA в преимущественной конформации и детального исследования процессов обмена между преимущественной и минорной конформациями.

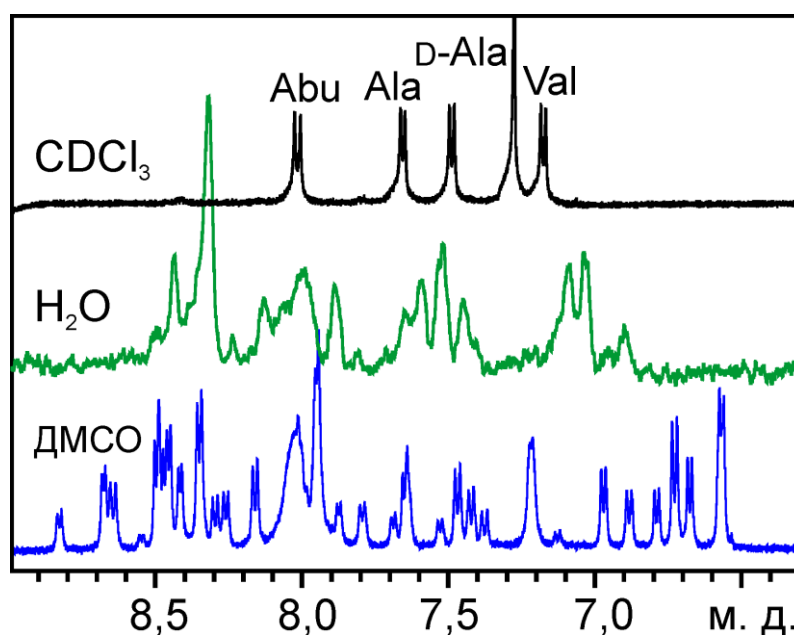
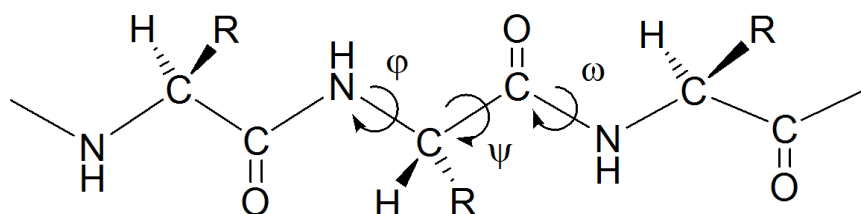


Рис. 7. Участок спектра ЯМР ^1H с сигналами амидных протонов циклоспорина в хлороформе, воде и ДМСО. (Bruker Avance II 500, 500,13 МГц.)

Сигналы ЯМР ^1H амидных (NH) протонов представляют собой дублеты с константами спин-спинового взаимодействия (КССВ) $^3J(\text{NH}, \text{H}\alpha)$. КССВ для четырёх NH-протонов молекулы CsA лежат в пределах 7,2–8,0 Гц. Величина КССВ зависит от конформации молекулы в области рассматриваемых ядер; в частности, для пептидных цепей она связана с двугранным углом φ ($\varphi_i = (\text{C}'_{i-1}-\text{N}_i-\text{C}^\alpha_i-\text{C}'_i)$, см. схему ниже). Значения константы J около 3–4 Гц соответствуют спиральным структурам ($\varphi = -57^\circ$); близкие к возможному максимуму (около 9 Гц) – β -листам ($\varphi = -119^\circ$ или -139°). Промежуточные значения (5–6 Гц) свидетельствуют о быстрых конформационных превращениях, что типично для неупорядоченных участков. Отсюда следует, что в данном случае преимущественная конформация циклоспорина CsA достаточно стабильна.



Для измерения скорости кросс-релаксации и вычисления межъядерных расстояний были записаны двумерные спектры ЯМР NOESY с различными временами смешивания. Анализ полученных спектров позволил определить 21 межпротонное расстояние, описывающее пространственное строение молекулы CsA в растворе хлороформа. Вместе с пятью расстояниями между атомами N и O (литературные данные по внутримолекулярным водородным связям) эти величины были использованы в качестве исходных данных для программы молекулярного моделирования XPLOR-NIH.

В целях получения дополнительной информации о структуре молекулы представляло интерес измерение остаточного диполь-дипольного взаимодействия в циклоспорине, растворённом в органических средах. Для этого была применена ориентирующая среда на базе деформированного геля.

Образующаяся при набухании полистирола в органических растворителях анизотропная среда (гель) пригодна для регистрации остаточного диполь-дипольного взаимодействия в молекулах, растворённых в геле. Величины RDC измерены с помощью двумерного ЯМР эксперимента HSQC-HECADE без развязки от КССВ ядер ^{13}C с протонами. Результаты приведены в таблице 3.

Таблица 3. Экспериментальные значения RDC циклоспорина в полистироловом геле ($^1D(\text{C,H})$) и химические сдвиги атомов α -групп.

Амино-кислота	δ , м. д.		$^1D(\text{C,H})$, Гц	Амино-кислота	δ , м. д.		$^1D(\text{C,H})$, Гц
	$^1\text{H}^\alpha$	$^{13}\text{C}^\alpha$			$^1\text{H}^\alpha$	$^{13}\text{C}^\alpha$	
1 Bmt	5,49	58,8	14,2	6 Mle	4,98	55,3	20,8
2 Abu	5,04	48,8		7 Ala	4,53	48,6	14,2
3 Sar ($\text{CH}^{\alpha 1}$)	4,74	50,3	3,8	8 D-Ala	4,84	45,2	15,4
3 Sar ($\text{CH}^{\alpha 2}$)	3,21		-16,5	9 Mle	5,70	48,2	-11,7
4 Mle	5,35	55,5	0,8	10 Mle	5,08	57,5	
5 Val	4,66	55,4	26,7	11 Mva	5,13	57,9	

Как было описано выше, можно оценить соответствие модельной структуры полученным в опыте величинам $^1D(\text{C,H})$, в нашем случае отвечающим взаимодействию ядер углерода и водорода в α -группах пептида. Количественной характеристикой может быть R-фактор или величина χ -квадрат. Результат моделирования преимущественной конформации молекулы циклоспорина в хлороформе с использованием межъядерных расстояний, вычисленных при анализе спектров NOESY, хорошо соответствует измеренным $^1D(\text{C,H})$: $R = 0,978$.

Как известно, анализ ЯЭО и величин остаточного диполь-дипольного взаимодействия дают принципиально различающиеся геометрические параметры. Величина ядерного эффекта Оверхаузера зависит от локальных расстояний между атомами, тогда как величины RDC сводятся к тензору ориентации \mathbf{A} и относятся к молекуле в целом. Моделирование методом молекулярной динамики в программе XPLOR-NIH с учётом двух типов структурных данных (ЯЭО и остаточного диполь-дипольного взаимодействия) позволило получить структуру молекулы CsA, удовлетворяющую как расстояниям, извлечённым из спектров NOESY (в пределах заложенных погрешностей), так и значениям RDC ($R = 0,999$). Эти корреляции представлены на рисунке 8. Как пример того, что качество корреляций отражает даже незначительные изменения структуры, на графике приведены данные для структуры из банка данных протеинов PDB (protein data bank) с индексом 1CWA (структура циклоспорина в комплексе с циклофилином), для которой $R = 0,914$.

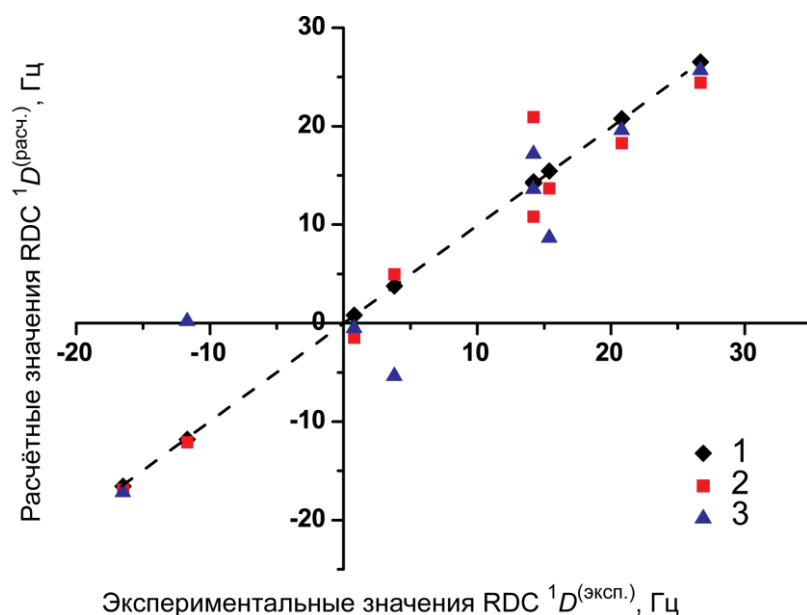


Рис. 8. Корреляции измеренных и рассчитанных величин $^1D(C,H)$ для трёх различных структур циклоспорина: (1) полученной моделированием, исходя из данных NOESY (межъядерные расстояния) с учётом RDC, (2) только по данным NOESY, (3) кристаллическая структура 1CWA.

В случае циклоспорина CsA были получены координаты атомов доминирующего конформера, тогда как в неполярных органических средах существуют и различные минорные формы. Для изучения этих форм (их характерного времени жизни, свободной энергии, свободной энергии активации) был применён метод обменной спектроскопии ЯМР – двумерный эксперимент EXSY (exchange spectroscopy – обменная спектроскопия), устроенный аналогично эксперименту NOESY и позволяющий измерять скорости обменных процессов от нескольких тысячных до десятых долей s^{-1} .

В спектрах ЯМР 1H присутствуют слабые сигналы (рис. 9), интегральные интенсивности которых позволяют вычислить долю минорного конформера – около 6% при комнатной температуре, что соответствует избытку свободной энергии $\Delta G_0 \sim 7$ кДж/моль. Отнесение сигналов к тем или иным ядрам в составе минорного конформера CsA произведено с помощью эксперимента EXSY. Кросс-пики, возникающие из-за обмена магнитного окружения ядер, отличаются от кросс-пиков ЯЭО фазой (при выполнении условия $\omega_0 \cdot \tau_c \ll 1$; см. рис. 10). Количественный анализ интенсивностей обменных кросс-пиков как функции времени смешивания позволил вычислить константу скорости обмена между преимущественной и минорной конформациями.

Свободная энергия ΔG^\ddagger активации и энтальпия ΔH^\ddagger активации конформационного перехода определены по зависимости скорости обмена от температуры. Данная зависимость представлена на рис. 11, а результаты анализа, характеризующие конформационное равновесие, протекающее в циклоспорине CsA, приведены в таблице 5.

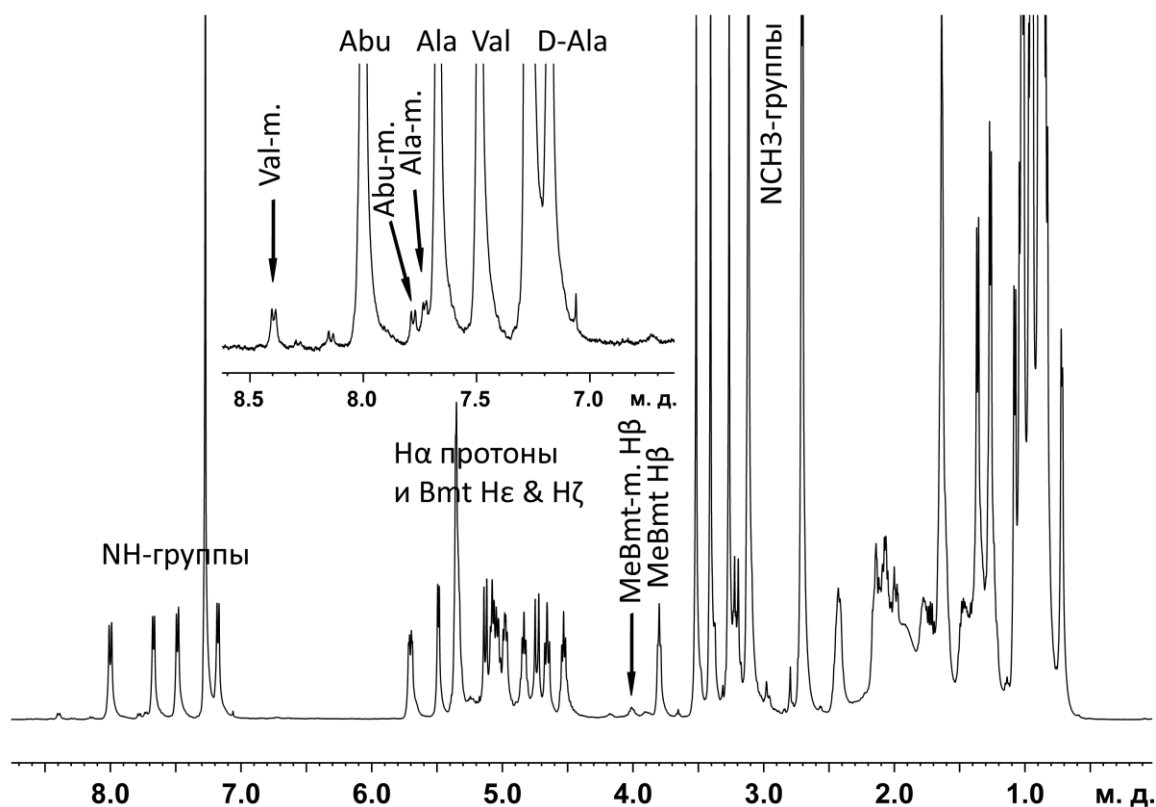


Рис. 9. Спектр ЯМР ^1H циклоспорина в хлороформе. Сигналы минорной формы идентифицированы с помощью спектров EXSY и обозначены «-m.». (Bruker Avance II 500, 500,13 МГц, $T = 293\text{ K}$.)

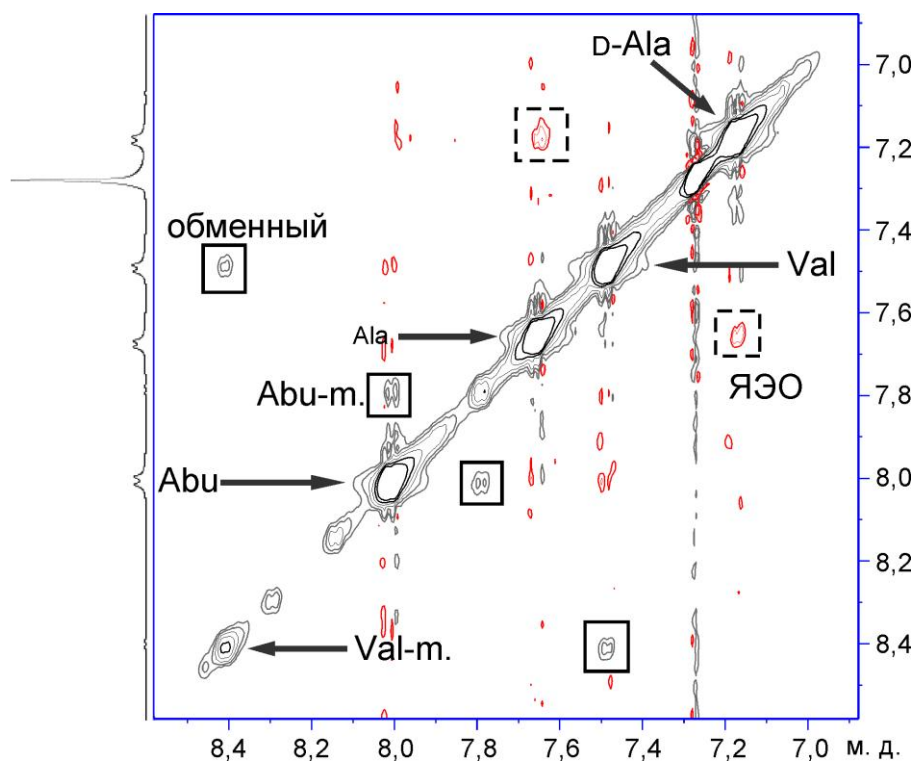


Рис. 10. Часть спектра NOESY (EXSY) циклоспорина в CDCl_3 . Обменные пики обведены сплошными квадратными рамками. (Bruker Avance II 500, 500,13 МГц, $T = 293\text{ K}$, $\tau_m = 360\text{ мс.}$)

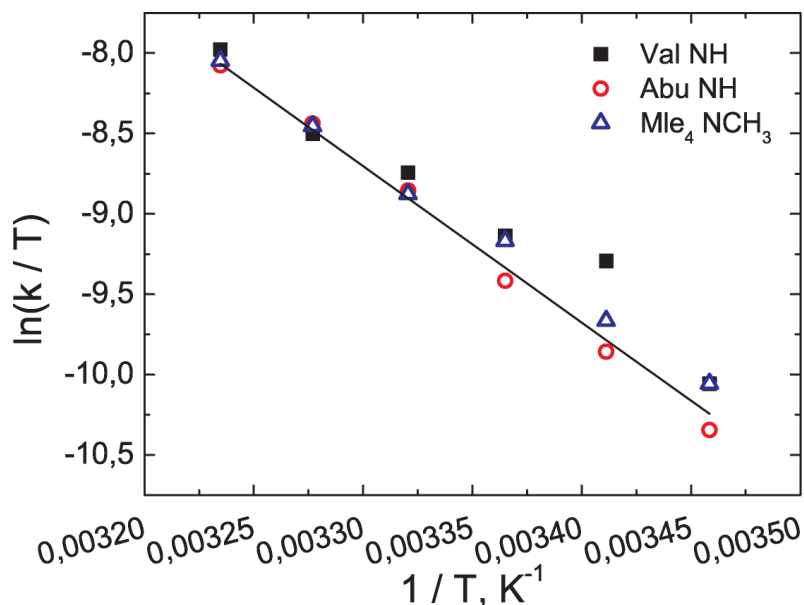


Рис. 11. Зависимость скоростей обмена от температуры в виде $\ln(k/T) = \ln(k_B/h) - \Delta G^\ddagger/RT$.

Таблица 5. Термодинамические параметры (в кДж/моль), характеризующие конформационный обмен циклоспорина CsA в $CDCl_3$. Погрешность определения ΔG^\ddagger и ΔH^\ddagger составляет 2 кДж/моль.

Атом	Химический сдвиг, м. д.		ΔG^\ddagger Т = 293 К	ΔH^\ddagger	ΔG_0 Т = 293 К
	Основной конформер	Минорный конформер			
Val NH	7,47	8,35	82	86	$7,3 \pm 0,4$
Abu NH	7,96	7,77	81	70	$6,6 \pm 0,2$
Bmt H β	3,79	3,97	80	69	$5,8 \pm 0,1$
Mle ⁴ NCH ₃	3,09	2,78	81	74	$6,8 \pm 0,4$

Сравнение химических сдвигов одноимённых атомов в двух конформерах выявляет наиболее значимые изменения у остатка Val⁵ (сигнал α -протона смещается на 0,3 м. д., а NH-протона – на 0,9 м. д. в слабое поле; см. рис. 12). Заметно смещаются резонансные частоты ядер в остатках Mle⁴, Mle⁶, Abu² и Bmt¹. Наблюдаемую картину можно трактовать как поворот остатка Val⁵, связанный с переходом прилегающей пептидной связи в *цис*-конформацию, что схематично отображено на рис. 13. Важно отметить, что одинаковая величина свободной энергии активации, полученная из анализа изменения интенсивностей кросс-пиков, связанных с ядрами в различных участках молекулы (остатки 1, 2, 4 и 5), свидетельствует в пользу единого процесса, затрагивающего всю молекулу. Довольно высокая величина свободной энергии активации (около 80 кДж/моль) типична для процессов *цис-транс* изомеризации пептидных связей.

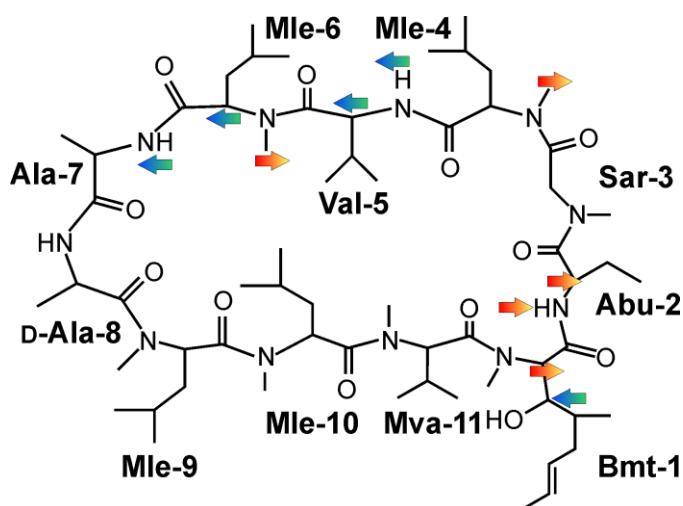


Рис. 12. Изменение величин химических сдвигов в минорном конформере CsA относительно аналогичных величин в доминирующем конформере (стрелки влево – сдвиг в слабое поле, вправо – в сильное поле).

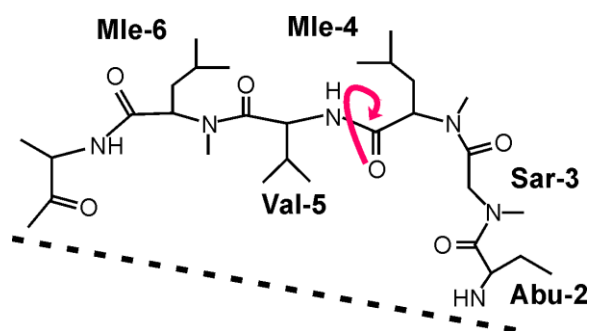


Рис. 13. Участок молекулы, претерпевающий трансформацию при образовании минорного конформера.

Третья глава диссертационной работы посвящена изучению пептидов в комплексе с модельной биологической мембраной. Исследования таких комплексов могут пролить свет на структуру молекул, для которых в растворе скорость кросс-релаксации мала. При этом важна, с точки зрения эксперимента ЯЭО, масса надмолекулярного образования, используемого в качестве модельной мембраны. В нашем случае это были мицеллы поверхностно-активного вещества – додецилсульфата натрия (ДСН) ($C_{12}H_{25}OSO_3Na$). Они состоят, в среднем, из 62 молекул ПАВ и имеют массу около 18 кДа. Время корреляции при этом имеет порядок наносекунд, поэтому в связанном виде исследуемые молекулы попадают в режим медленного движения ($\omega_0 \cdot \tau_c \gg 1$).

В целях проверки возможностей этого подхода для исследования олигопептидов были изучены трипептид глицил-глицил-гистидин (Gly-Gly-His), декапептид (Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly), а также циклоспорин (цикло(-Bmt-Abu-Sar-Mle-Val-Mle-Ala-DAla-Mle-Mle-Mva-)).

Пептиды растворялись в воде вместе с таким количеством ДСН, чтобы концентрация последнего превысила порог мицеллообразования. Добавка ПАВ вызывает смещение сигнала амидных протонов трипептида $Gly^2(NH)$, $His^3(NH)$ в область сильного поля на 0,15–0,40 м. д. (рис. 14). Увеличение концентрации пептида разрушительно влияет на мицеллярную систему: ДСН выпадает в осадок, а спектр Gly-Gly-His при этом становится практически таким же, как у трипептида, растворённого в чистой воде.

Взаимодействие трипептида с мицеллами ДСН имеет неустойчивый характер. Изменение химических сдвигов протонов может быть обусловлено обратимым образованием комплекса, затрагивающим гидрофобную часть молекулы – остаток His. Чтобы пронаблюдать более устойчивый комплекс и его влияние на спектры ЯМР, были проведены эксперименты с молекулой декапептида.

Результаты приписания сигналов ЯМР декапептида для двух сред – изотропного и мицеллярного растворов в воде, – сведены в таблицу 6. Из представленных результатов видно, что по сравнению с данными для водного раствора, химические сдвиги молекулы в связанном виде другие, что может быть обусловлено образованием комплекса с мицеллами и изменением конформации. Важно также отметить, что если спектр ЯМР NOESY декапептида в воде был малоинформативен, то для комплекса пептид – мицеллы ДСН наблюдались многочисленные кросс-пики того же знака, что и диагональные сигналы (рис. 15). Вышеприведённые факты подтверждают образование комплекса декапептида с мицеллами ДСН.

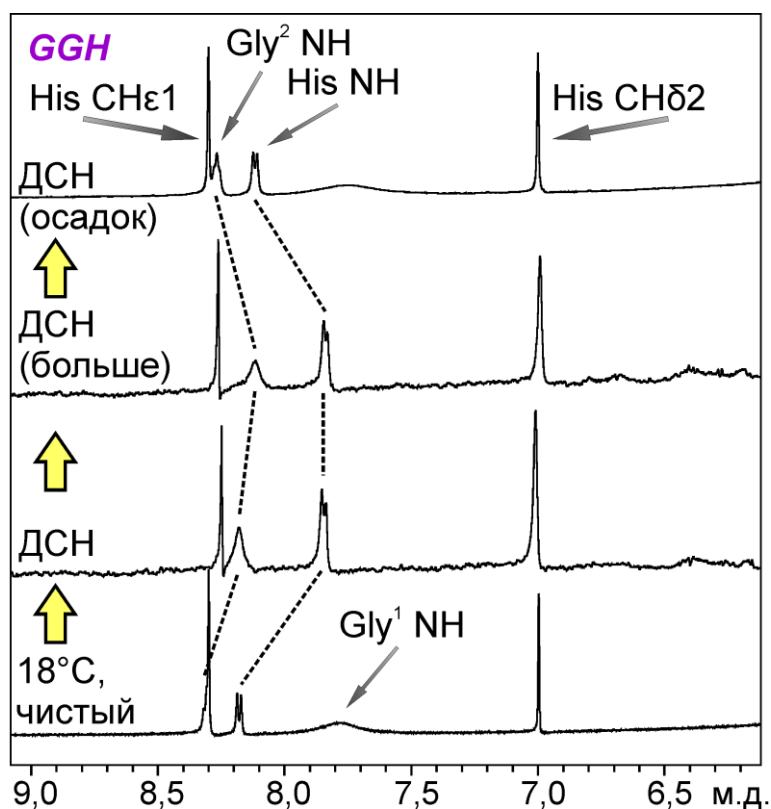


Рис. 14. Низкопольная часть спектра ЯМР ^1H трипептида Gly-Gly-His в воде в присутствии ДСН и без него. (Bruker Avance II 500, 500,13 МГц, $T = 293\text{ K}$, запись велась в смеси $\text{H}_2\text{O} / \text{D}_2\text{O}$.)

Таблица 6. Химические сдвиги ЯМР ^1H пептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly в комплексе с мицеллами ДСН при 298 К, м. д. Химические сдвиги, измеренные в растворе в D_2O , даны в скобках.

Ост.	$\delta(\text{H}\alpha)$	$\delta(\text{H}\beta)$	$\delta(\text{NH})$	Ост.	$\delta(\text{H}\alpha)$	$\delta(\text{H}\beta)$	$\delta(\text{NH})$
Val	3,85	1,91	8,14	Thr	4,28	4,24	7,96
Ile	4,20 (4,17)	1,64 (1,72)	8,01	Ala	4,33 (4,28)	1,38 (1,32)	8,15
Lys	4,30	1,71 (1,64)	8,03	Leu	4,40 (4,36; 4,29)	1,63 (1,60)	7,81
Ser	4,44 (4,47)	3,93; 3,86 (3,87; 3,71)	8,16	Gly	3,79 (3,82)	—	7,83

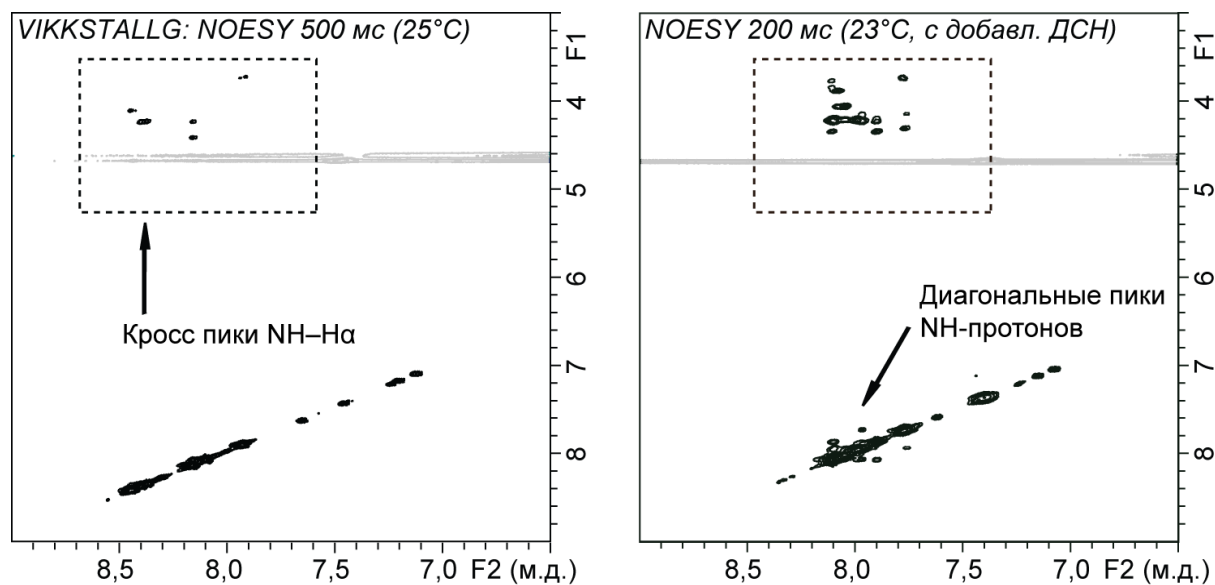


Рис. 15. Характерные участки спектров ЯМР NOESY декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly в воде и системе вода / ДСН. (Bruker Avance II 500, 500,13 МГц, левый спектр – $T = 298$ К и $\tau_m = 500$ мс, правый спектр – $T = 296$ К и $\tau_m = 200$ мс.)

Для изучения поведения и структуры циклоспорина в комплексе с модельной мембраной были приготовлены растворы ДСН в тяжёлой воде и смеси D_2O / H_2O . Спектры ЯМР 1H подтверждают, что так же, как и в неполярных средах, здесь доминирует одна конформация. Резонансные частоты протонов амидных групп смещены в высокочастотную область (7,5–8,0 м. д.). Это изменение, затрагивающее атомы в разных участках молекулы (NH-группы присутствуют в позициях 2, 5, 7 и 8), должно носить глобальный характер. Как в случае раствора в органических средах, мы имеем указание на существование второго конформера.

Двумерные спектры ЯМР NOESY подтверждают образование комплекса CsA с мицеллами ДСН (кросс-пики положительные, что соответствует пределу медленного движения). Анализ интенсивностей кросс-пигов дал набор межъядерных расстояний (таблица 7), использованных на этапе моделирования структуры. Визуальное сравнение (рис. 16) выявляет некоторое различие структур молекулы в комплексе с мицеллой и в $CDCl_3$: кольцо молекулы более округлое, что соответствует отсутствию в спектрах NOESY наблюдаемых кросс-пигов между дальними аминокислотами в 1 и 6 позициях.

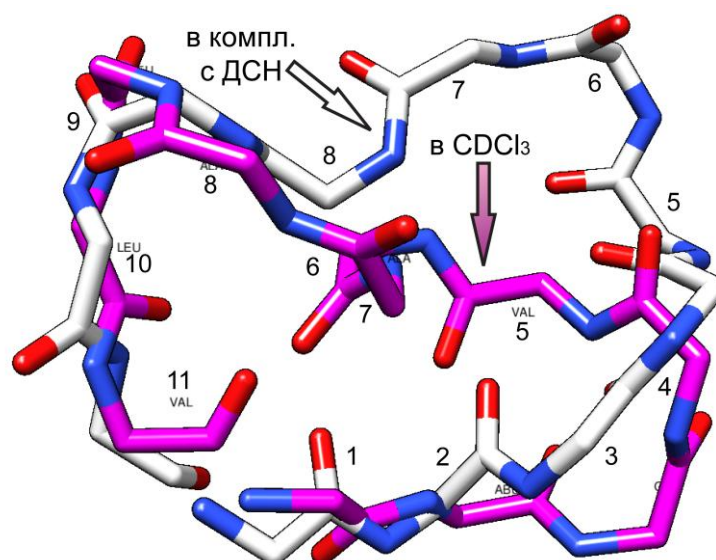


Рис. 16. Преимущественные конформации CsA в комплексе с модельной мембраной и в растворе в CDCl_3 по результатам молекулярного моделирования.

Таблица 7. Геометрические параметры преимущественной конформации циклоспорина в комплексе с мицеллами ДСН, полученные на базе спектров NOESY, записанных при 300 К.

Пара атомов		$r_{ab}, \text{Å}$	Пара атомов		$r_{ab}, \text{Å}$
Abu H^α	Abu $\text{H}^{\beta 1}$	2,8 – 3,4	NCH_3	H^α	
Abu H^α	Abu $\text{H}^{\beta 2}$	2,7 – 3,3	Sar	Abu	2,2 – 3,2
Bmt H^α	Bmt H^β	2,3 – 2,9	Bmt	Mva	2,2 – 3,2
Bmt $\text{H}^{\delta 11}$	Bmt H^ϵ	2,8 – 3,4	Mle ⁹	Dal	2,6 – 3,8
Bmt $\text{H}^{\delta 12}$	Bmt H^ϵ	2,6 – 3,2	Mle ⁶	Val	2,6 – 3,6
Mva H^α	Mva H^β	2,8 – 3,4	Mva	Mle ¹⁰	2,1 – 3,1
Val H^α	Val H^β	2,9 – 3,5	Mle ⁴	Sar $\text{H}^{\alpha 1}$	2,2 – 3,2
Mle ⁶ H^α	Mle ⁶ $\text{H}^{\beta 1}$	2,9 – 3,5	Mle ⁴	Sar $\text{H}^{\alpha 2}$	2,4 – 3,4
Mle ⁶ H^α	Mle ⁶ H^γ	2,6 – 3,4	Mle ⁹	Mle ⁹	2,5 – 3,5
Mle ⁴ H^α	Mle ⁴ $\text{H}^{\beta 1}$	2,1 – 2,7	Mle ⁴	Mle ⁴	2,4 – 3,4
Mle ⁹ H^α	Mle ⁹ $\text{H}^{\beta 1}$	2,3 – 2,9	Sar	Sar $\text{H}^{\alpha 2}$	2,5 – 3,5
Mle ⁹ H^α	Mle ⁹ $\text{H}^{\beta 2}$	2,4 – 3,0	Mva	Mva	2,8 – 3,8
Mle ⁹ H^α	Mle ⁹ H^γ	2,7 – 3,5			
Mle ⁹ H^α	Mle ¹⁰ H^α	2,0 – 2,8			

В четвёртой главе диссертации приводятся детали постановки экспериментов и параметры регистрации спектров ЯМР. Использован спектрометр Avance II 500 фирмы «Bruker», входящий в состав научного оборудования Федерального центра коллективного пользования физико-химических исследований веществ и материалов К(П)ФУ.

Основные выводы и результаты.

1. Совокупностью методов одно- и двумерной спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C (NOESY, TOCSY и др.) и расчётного моделирования (в программах XPLOR-NIH, MODULE, DYNAMO) исследована структура и внутримолекулярная подвижность пептидов $\gamma\text{Glu-Trp}$, Gly-Gly-His , $\text{Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly}$ и циклоспорина CsA ($\gamma\text{Glu-Trp}$ и циклоспорин – биологически активные). Осуществлено полное отнесение сигналов ЯМР ^1H и ^{13}C .

2. Анализом данных двумерной спектроскопии ЯМР ^1H - ^1H NOESY и анализом величин остаточного диполь-дипольного взаимодействия ($^1D(\text{C,H})$) определено пространственное строение исследованных олигопептидов в растворах: гамма-глутамил-триптофана в воде, циклоспорина в хлороформе и бензоле. Структуры построены в формате PDB (координаты атомов) с применением метода молекулярной динамики.

3. Впервые показано, что циклоспорин в растворе хлороформа существует в конформационном равновесии двух форм с преимуществом одной из них (94:6). Найдены термодинамические параметры обмена между конформациями. Предложено объяснение наблюдаемого конформационного равновесия, как *цис-транс* изомеризации пептидной связи, смежной с остатком Val^5 .

4. Впервые экспериментально показана возможность изучения олигопептидов в режиме медленного движения благодаря образованию комплекса с мицеллами додецилсульфата натрия (ДСН), что обеспечивает высокую интенсивность кросс-пиков в двумерных спектрах ЯМР NOESY. Данный подход позволил определить пространственную структуру декапептида в комплексе с мицеллой.

5. Определена пространственная структура циклоспорина (атомные координаты в формате PDB) в комплексе с мицеллой на основе ДСН. Проведено сравнение строения молекулы в растворе и комплексе CsA – мицеллы ДСН, выявившее различие структур, обусловленное влиянием стерических взаимодействий с молекулами ДСН.

Публикации автора по теме диссертации.

1. Spatial structure of cyclosporin A and insight into its flexibility / S. V. Efimov, F. Kh. Karataeva, A. V. Aganov, S. Berger, V. V. Klochkov // J. Mol. Struct. – 2013. – Vol. 1036. – P. 298-304.
2. Efimov, S. V. NMR studies and molecular dynamics simulation of cyclosporin in complex with detergent micelles / S. V. Efimov, V. V. Klochkov // Magn. Resonance in Solids. EJ. – 2012. – Vol. 14, No. 2. – 12202 (5 pp.).
3. Manin, A. Y. Obtaining spatial structure of cyclosporine (CsA) in chloroform using 2D NMR / A. Y. Manin, S. V. Efimov, V. V. Klochkov // Magn. Resonance in Solids. EJ. – 2011. – Vol. 13, № 2. – P. 21-26.
4. Пространственное строение декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly в комплексе протеин – мицеллы додецилсульфата натрия / Д. С. Блохин, С. В. Ефимов, А. В. Клочков, А. Р. Юльметов, А. В. Филиппов, А. В. Аганов, В. В. Клочков // Учёные записки Казанского государственного университета : Сер. Естественные науки. – 2011. – Т. 153, № 1. – С. 59-70.
5. Spatial structures of tripeptides glycylglycyl-L-histidine and glycylglycyl-L-tyrosine based on residual dipolar couplings and quantum-chemical computations / V. V. Klochkov, A. V. Klochkov, M. N. Shamsutdinov, S. V. Efimov, A. A. Krutikov, E. M. Gilyazetdinov, Yu. I. Zyavkina, V. G. Shtyrlin // Mendeleev Communications. – 2011. – Vol. 21, № 2. – P. 72-74.
6. Пространственное строение дипептида γ Glu-Trp, определённое путём 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 // Учёные записки Казанского государственного университета : Сер. Естественные науки. – 2010. – Т. 152, № 4. – С. 206-214.
7. 3D структура олигопептидов Тимоген (Glu-Trp) и Bestim (γ Glu-Trp) / Г. А. Азиатская, С. В. Ефимов, А. В. Клочков, В. В. Клочков, Ф. Р. Мухамадиев, Н. В. Курбатова, Р. Ф. Байкеев // Астраханский медицинский журнал. – 2010. – Т. 5, № 1. – С. 20-21.
8. Efimov, S. V. NMR Studies and Molecular Dynamics Simulation of Cyclosporin in Complex with Detergent Micelles / S. V. Efimov, V. V. Klochkov // Proceedings of the XV International Youth Scientific School «Actual problems of magnetic resonance and its application», 22 – 26 October 2012, Kazan. – Kazan : Kazan University, 2012. – P. 75-78. – ISBN 978-5-905787-85-0.
9. Efimov, S. V. Conformational Mobility of Cyclosporin A / S. V. Efimov, V. V. Klochkov // School for Young Scientists «Magnetic Resonance and Magnetic Phenomena in Chemical and Biological Physics», 16 – 21 июля 2012. : сб. тез. – Новосибирск : 2012. – С. 66.
10. Ефимов, С. В. Конформация молекулы циклоспорина в неполярных средах: хлороформе и мицеллярных растворах / С. В. Ефимов, А. Ю. Манин, В. В. Клочков // XI Научная конференция молодых учёных, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского (Приволжского)

федерального университета «Материалы и технологии XXI века», 17 мая 2012 : сб. тез. – Казань : 2012. – С. 84.

11. Ефимов, С. В. Структура циклоспорина в мицеллах и органических растворителях / С. В. Ефимов, А. В. Аганов, В. В. Клочков // V Всероссийская конференция «Новые достижения ЯМР в структурных исследованиях», 20 – 22 апреля 2011 : сб. тез. – Казань : 2011. – С. 100-101.
12. Изменения молекулы циклоспорина в различных средах / С. В. Ефимов, А. Р. Юльметов, А. В. Аганов, В. В. Клочков // X Научная конференция молодых учёных, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского (Приволжского) федерального университета «Материалы и технологии XXI века», 28 – 29 марта 2011 : сб. тез. – Казань : 2011. – С. 43.
13. Исследование циклоспорина методом ЯМР в мицеллярном растворе / С. В. Ефимов, А. Р. Юльметов, А. В. Аганов, В. В. Клочков // 7 Зимняя молодёжная школа-конференция «Магнитный резонанс и его приложения», 29 ноября – 4 декабря 2010 : сб. тез. – Санкт-Петербург : 2010. – С. 70-71.
14. Структура молекулы циклоспорина в хлороформе по данным спектроскопии ЯМР / С. В. Ефимов, А. Р. Юльметов, А. В. Аганов, В. В. Клочков // Всероссийская молодёжная школа с международным участием «Магнитный резонанс в химической и биологической физике», 6 – 10 сентября 2010. : сб. тез. – Новосибирск : 2010. – С. 56.
15. High-resolution NMR study of cyclosporine A in various solvents / S. V. Efimov, A. R. Yulmetov, A. V. Aganov, V. V. Klochkov // Nuclear Magnetic Resonance in Condensed Matter: abstracts of the International Symposium and Summer School, 7th meeting: “NMR in Heterogeneous Systems”, 28 June – 2 July 2010. – Saint-Petersburg : Solo, 2010. – P. 72. – ISBN 978-5-98340-239-3.
16. Efimov, S. V. High-resolution NMR studies of cyclosporine A / S. V. Efimov, A. R. Yulmetov, V. V. Klochkov // Proceedings of the XII International Youth Scientific School «Actual problems of magnetic resonance and its application», 5 – 9 October 2009, Kazan. – Kazan : Kazan State University, 2009. – P. 184-186. – ISBN 978-5-98180-722-0.