



УДК 577.182.26.088.5:577.322.5:543.422.25

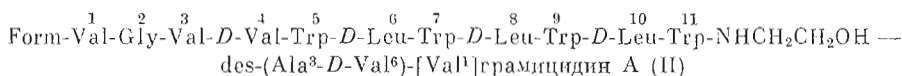
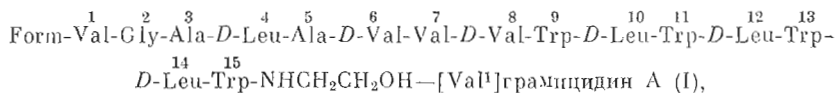
## 2D-<sup>1</sup>H-ЯМР-АНАЛИЗ КОНФОРМАЦИИ des-(Ala<sup>3</sup>-D-Val<sup>6</sup>)-[Val<sup>1</sup>]ГРАМИЦИДИНА А В РАСТВОРЕ. ПРАВая ПАРАЛЛЕЛЬНАЯ ДВОЙНАЯ СПИРАЛЬ

Арсеньев А. С., Барсукоз П. Л., Шепель Е. Н.,  
Быстров В. Ф., Иванов В. Т.

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

Исследованы двумерные <sup>1</sup>H-ЯМР-спектры (COSY, 2QT, NOESY, NOERELSY) димерной формы des-(Ala<sup>3</sup>-D-Val<sup>6</sup>)-[Val<sup>1</sup>]грамицидина А в диоксане. Проведено полное отнесение сигналов. Анализом ядерного эффекта Оверхаузера между протонами соседних и удаленных по аминокислотной последовательности остатков, констант спин-спинового взаимодействия H-NC<sup>α</sup>-H и скоростей дейтерообмена водородов амидных групп определена конформация основной цепи молекулы, представляющая собой правую параллельную двойную спираль типа  $\uparrow\downarrow\pi\pi_{LD}^{5,6}$  с 5,6 остатка на виток. Структурные параметры двойной спирали этого типа удовлетворяют требованиям, предъявляемым к пространственному строению трансмембранного канала грамицидина А.

Пространственная структура антибиотика грамицидина А в растворе и образованного им трансмембранного канала уже 15 лет привлекает внимание исследователей (см. [1, 2] и приведенные там ссылки). При этом наибольший интерес вызывает структура димера грамицидина А, поскольку именно в виде такого ассоциата антибиотик функционирует в качестве канала [3]. Проблема осложняется тем, что грамицидин А в неполярных средах образует по меньшей мере четыре устойчивые, медленно переходящие одна в другую формы (так называемые формы 1–4), соответствие которых каналобразующим формам остается неясным. Для димера грамицидина А предложена серия альтернативных спиральных структур [4–7], охарактеризованных с помощью спектральных методов [6] и теоретического конформационного анализа [8]. Сравнение расчетных и экспериментальных ИК-спектров позволило приписать каждой из форм 1–4 определенный тип спирали [9]. Пространственная структура одной из них, кристаллической формы 3 [Val<sup>1</sup>]грамицидина А (I), образующей в растворе диоксана антипараллельную двойную спираль типа  $\uparrow\downarrow\pi\pi_{LD}^{5,6}$ , установлена ранее анализом двумерных (2D) спектров ЯМР [10, 11]. Выделение форм 1, 2 и 4 природного грамицидина А в индивидуальном состоянии сопряжено с существенными экспериментальными трудностями [6]. Вместе с тем известны синтетические аналоги грамицидина А, имеющие стабильные структуры с иной, чем в форме 3, конформацией полипептидного остова [9]. В настоящей работе методом 2D-спектроскопии ЯМР изучена конформация димера одного из таких аналогов (II), содержащего 11 аминокислотных остатков вместо 15 у природного грамицидина А (I)\*:



*Отнесение сигналов в <sup>1</sup>H-ЯМР-спектрах. Сразу после растворения пеп-*

\* Здесь и далее для аминокислот L-ряда конфигурационный символ опущен.

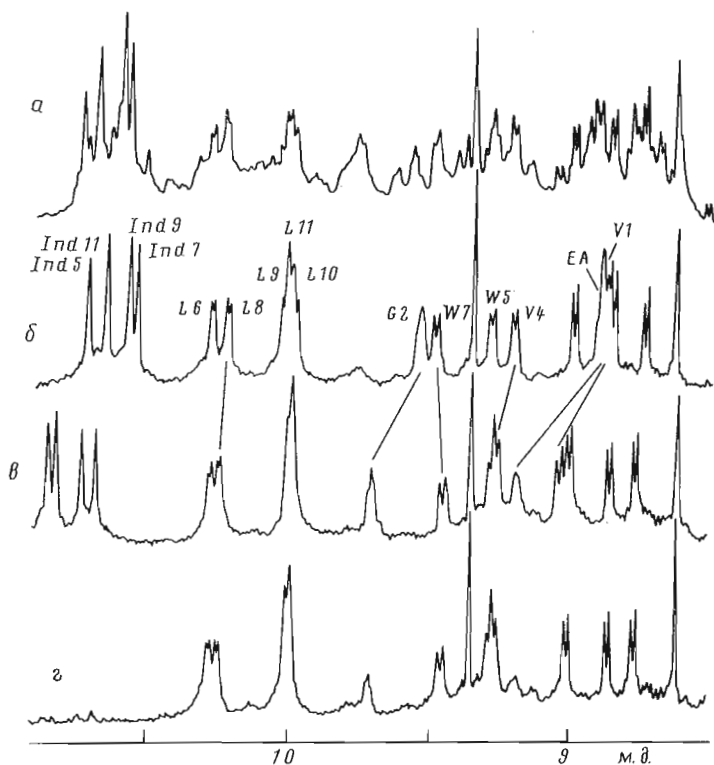


рис. 1. Область сигналов амидных протонов  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектра 0,005 М раствора пептида (II) в диоксане- $d_8$  при  $30^\circ\text{C}$ : спектр снят сразу после растворения образца (а), через 12 ч после растворения образца (б), образец б после добавления 3%  $^2\text{H}_2\text{O}$  (в) и через 10 ч после добавления  $^2\text{H}_2\text{O}$  (г). Здесь и далее буквы и цифры указывают в однобуквенном коде отнесение сигнала к соответствующему остатку в аминокислотной последовательности (V-Val, A-Ala, G-Gly, L-Leu, W-Trp), EA — С-концевая этаноламидная группа, Ind — сигнал от протона NH индольной группы соответствующего остатка триптофана

тида (II) в диоксане в спектре  $^1\text{H}$ -ЯМР проявляется смесь медленно конвертируемых форм (рис. 1а). После выдерживания образца при  $30^\circ\text{C}$  в течение 12 ч достигается равновесие и преобладает ( $>90\%$ ) одна форма (рис. 1б), конформация которой исследована в настоящей работе. ИК- и КД-спектры этого образца идентичны полученным ранее в аналогичных условиях [9].

Отнесение сигналов от протонов (II) (табл. 1) проведено в два этапа. Сначала в 2D-спектрах выделены спиновые системы протонов аминокислотных остатков. В большинстве случаев анализ коррелированного по скалярному спин-спиновому взаимодействию (ССВ) спектра типа COSY (рис. 2 и 3) не вызывает затруднений. Однако, если химические сдвиги протонов двух аминокислотных остатков совпадают, COSY-спектры не позволяют однозначно провести отнесение сигналов. Например, химические сдвиги протонов  $\text{C}^\alpha\text{H}$  остатков  $D\text{-Leu}^8$  и  $D\text{-Leu}^{10}$  совпадают (5,90 м.д.— см. рис. 3 и табл. 1), и поэтому нельзя однозначно свести сигналы от протонов NH (10,19 и 9,96 м.д.) и  $\text{C}^\beta\text{H}_2$  (2,97; 2,59 и 2,60; 2,46 м.д.) этих остатков в спиновые системы NH —  $\text{C}^\alpha\text{H}$  —  $\text{C}^\beta\text{H}_2$ . В этом случае мы использовали двухквантовые 2D-спектры (2QT) (рис. 4). Согласно правилам отбора [12], двухквантовая когерентность двух спинов, например А и X, может быть передана одноквантовому переходу спина М, если константы скалярного ССВ ( $J$ ) спина М с обоими спинами А и X имеют достаточную величину, чтобы проявляться в спектре ЯМР. На практике для остатков  $D\text{-Leu}^8$  и  $D\text{-Leu}^{10}$  это означает, что в 2QT-спектре будут наблюдаться кросс-пики с координатами  $\omega_1 = \omega_{\text{NH}} + \omega_{\text{C}^\beta\text{H}_2}$  и  $\omega_2 = \omega_{\text{C}^\alpha\text{H}}$ . В этой области 2QT-спектра (рис. 4) наблюдаются кросс-пики с координатами  $\omega_2$  5,90 и  $\omega_1$  12,53 и 13,15 м.д. Простой комбинаторный анализ показывает, что с точ-

Химические сдвиги ( $\delta$ , м.д.) протонов des-(Ala<sup>3</sup>-D-Val<sup>6</sup>)-[Val<sup>1</sup>]грамцидина А при 30° С в диоксане-*d*<sub>3</sub>

Аминокислотный остаток	NH	C <sup><math>\alpha</math></sup> H	C <sup><math>\beta</math></sup> H	Другие протоны
Формильная группа				HCO 9,32
Val <sup>1</sup>	8,87	5,86	3,17	C <sup><math>\gamma</math></sup> H <sub>3</sub> 2,13; 2,13
Gly <sup>2</sup>	9,55	5,49; 5,09		
Val <sup>3</sup>	8,35	6,82	3,09	C <sup><math>\gamma</math></sup> H <sub>3</sub> 2,14; 1,98
D-Val <sup>4</sup>	9,19	4,85	2,77	C <sup><math>\gamma</math></sup> H <sub>3</sub> 1,80; 1,25
Trp <sup>5</sup>	9,25	6,77	4,23; 4,23	N1-H 10,70, C2-H 8,60 C4-H 8,96, C5-H 7,94, C6-H 8,07, C7-H 8,36
D-Leu <sup>6</sup>	10,24	5,81	2,71; 2,26	C <sup><math>\gamma</math></sup> H 1,31, C <sup><math>\delta</math></sup> H <sub>3</sub> 1,66; 1,48
Trp <sup>7</sup>	9,45	7,06	4,11; 3,94	N1-H 10,53, C2-H 7,73, C4-H 8,35, C5-H 7,85, C6-H 8,05, C7-H 8,26
D-Leu <sup>8</sup>	10,19	5,90	2,97; 2,59	C <sup><math>\gamma</math></sup> H 1,68, C <sup><math>\delta</math></sup> H <sub>3</sub> 1,88; 1,73
Trp <sup>9</sup>	9,99	6,84	4,41; 4,24	N1-H 10,56, C2-H 8,03, C4-H 8,82, C5-H 8,03, C6-H 8,09, C7-H 8,30
D-Leu <sup>10</sup>	9,96	5,90	2,60; 2,46	C <sup><math>\gamma</math></sup> H 2,00, C <sup><math>\delta</math></sup> H <sub>3</sub> 1,96; 1,83
Trp <sup>11</sup>	9,97	5,68	4,24; 4,14	N1-H 10,65, C2-H 7,99, C4-H 8,71, C5-H 8,18, C6-H 8,22, C7-H 8,40
Этаноламидная группа	8,94	5,20; 4,35	5,14; 4,17	

ностью до погрешности измерения  $\pm 0,01$  м.д. координата  $\omega_1$  12,53, равная  $9,96 + 2,46$  м.д., соответствует двухквантовой когерентности  $\omega_{NH} + \omega_{C\beta H}$  остатка D-Leu<sup>10</sup>, а координата  $\omega_1$  13,15, равная  $10,19 + 2,97$  м.д., — двухквантовой когерентности остатка D-Leu<sup>8</sup>.

Затруднения при отнесении сигналов в COSY-спектрах также возникали, если химические сдвиги от протонов, связанных ССВ, близки. В этих случаях в COSY-спектре кросс-пики, соответствующие ССВ, маскируются интенсивными диагональными ( $\omega_1 = \omega_2$ ) сигналами. В 2QT-спектре диагональ  $\omega_1 = 2\omega_2$  отсутствует, и обнаружение ССВ между протонами с близкими химическими сдвигами не вызывает затруднений. Поэтому соотнесение химических сдвигов сигналов для протонов C <sup>$\gamma$</sup> H—(C <sup>$\delta$</sup> H<sub>3</sub>)<sub>2</sub> остатков D-Leu<sup>8</sup> и D-Leu<sup>10</sup> проведено также с помощью анализа 2QT-спектров.

Еще один пример отнесения сигналов в 2QT-спектре пептида (II) показан на рис. 5. Установлено, что в спиновых системах протонов C4-H—C5-H—C6-H—C7-H индольных групп триптофановых остатков эффективны не только ССВ вицинальных протонов, но и дальние ССВ:  ${}^4J_{C4-H-C6-H}$ ,  ${}^4J_{C5-H-C7-H}$  и  ${}^5J_{C4-H-C7-H}$  (рис. 5а). Теоретически это означает, что двухквантовая когерентность может быть возбуждена для любой пары протонов во фрагменте C4-H—C5-H—C6-H—C7-H и передана любому одноквантовому переходу этой спиновой системы. В реальных условиях опыта эффективность возбуждения двухквантовой когерентности и ее передачи одноквантовому переходу зависит от величины констант ССВ в спиновой системе и выбора интервала  $\tau$  (см. «Экспериментальную часть»). На рис. 5б представлен теоретический 2QT-спектр для четырехспиновой системы протонов C4-H—C5-H—C6-H—C7-H с указанием интенсивности кросс-пигов, наблюдаемых в экспериментальном спектре (рис. 5а). Несмотря на то что часть предсказанных кросс-пигов отсутствует в нем, можно надежно идентифицировать спиновые системы индольных протонов C4-H—C5-H—

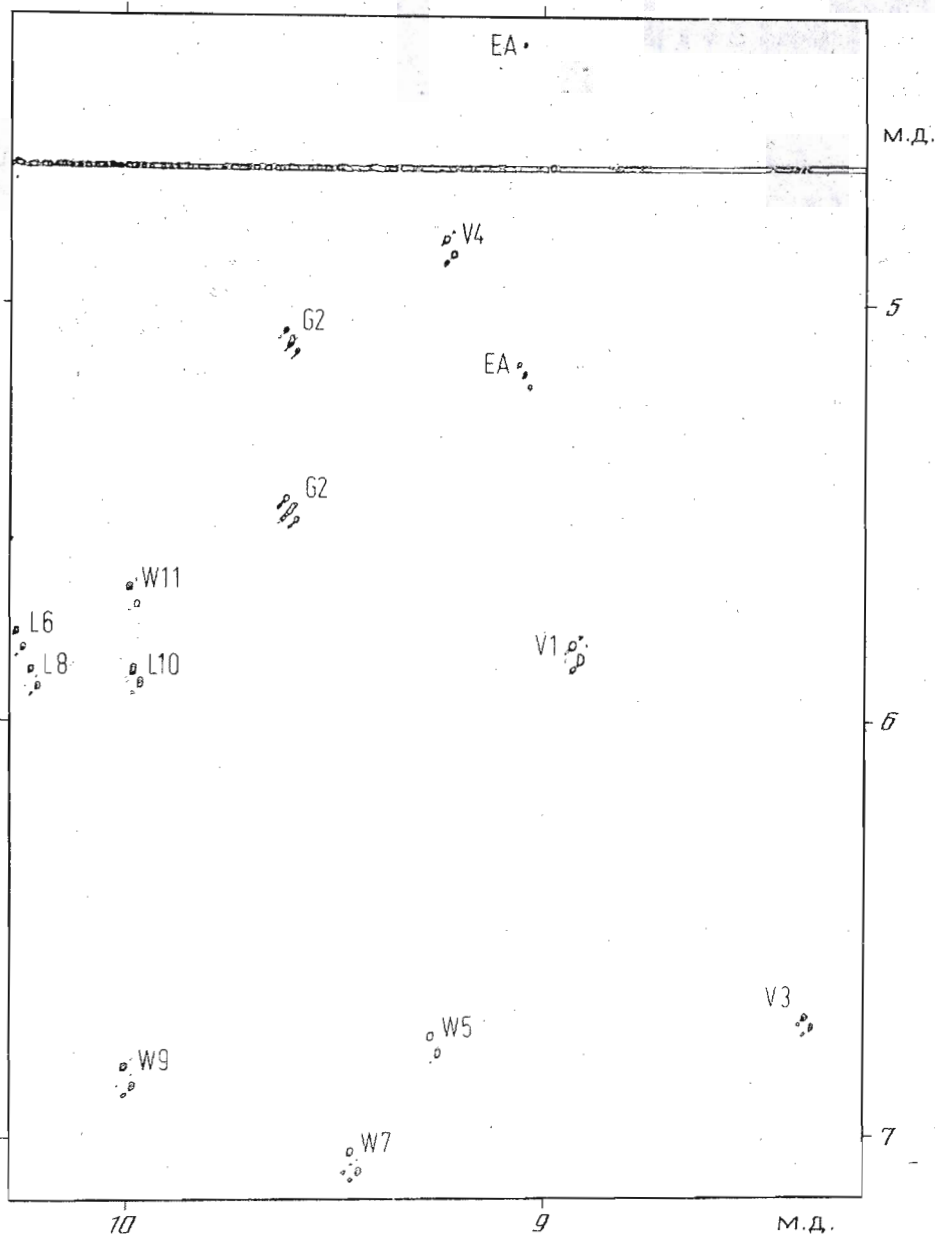


Рис. 2. Спектральная область  $\omega_1$  4,30–7,15 м. д.,  $\omega_2$  8,2–10,3 м. д. фазоизбирательного COSY-спектра 0,01 М раствора пептида (II) в диоксане- $d_8$  при 30° С. Спектр получен накоплением в течение 36 ч. Цифровое разрешение 2,44 Гц на точку для  $\omega_1$  и 0,76 Гц на точку для  $\omega_2$ . Показаны только положительные компоненты кросс-пиков. Интенсивная полоса при  $\omega_1$  4,67 м. д. обусловлена сигналом растворителя

C6-H – C7-H даже в условиях сильного перекрывания пиков. Например, для остатка Trp<sup>5</sup> при  $\omega_2 = \omega_{C4-H}$  (8,95 м.д.) наблюдается интенсивный кросс-пик при  $\omega_1 = \omega_{C4-H} + \omega_{C5-H}$  (10,90 м.д.) и кросс-пики малой интенсивности при  $\omega_1$  17,01; 16,26 и 15,98 м.д. для двухквантовых когерентностей  $\omega_{C4-H} + \omega_{C6-H}$ ,  $\omega_{C5-H} + \omega_{C7-H}$  и  $\omega_{C5-H} + \omega_{C6-H}$  соответственно. Отсюда можно легко найти химические сдвиги протонов C5-H, C6-H, C7-H.

Спиновые системы протонов N1-H и C2-H индольных групп триптофановых остатков выделены в COSY- и 2QT-спектрах и связаны со спиновыми системами C4-H – C5-H – C6-H – C7-H с помощью ядерного эффекта

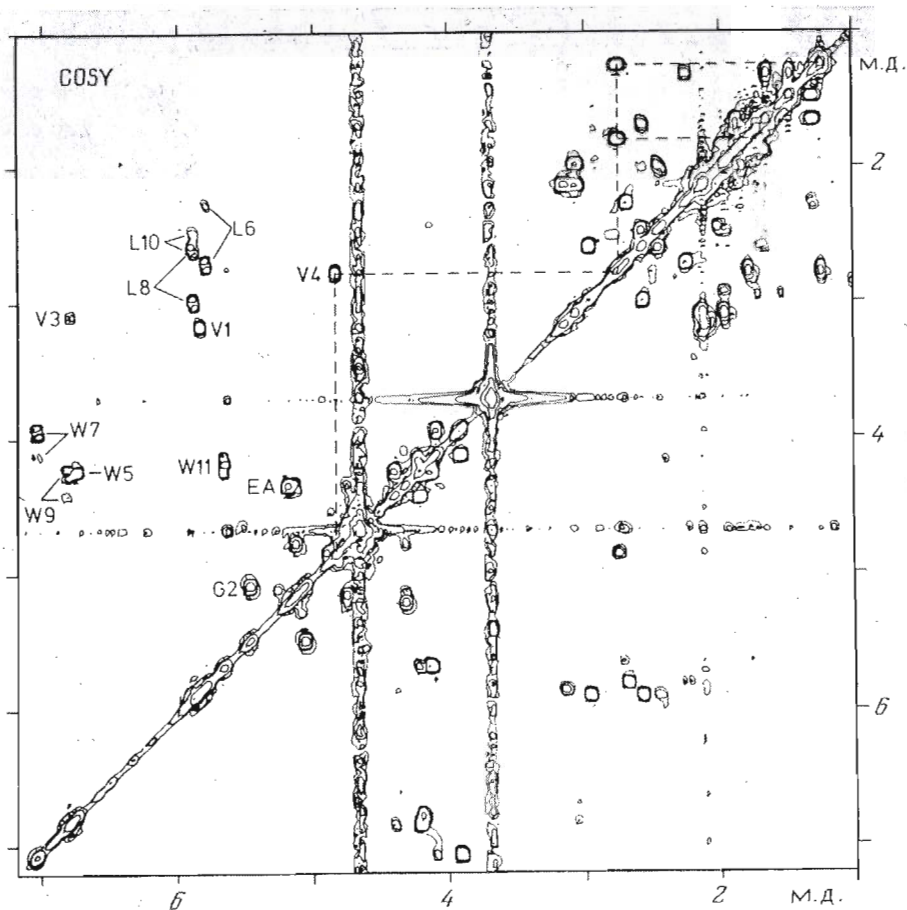


Рис. 3. Алифатическая область  $\omega_1$ ,  $\omega_2$  1,0–7,2 м.д. COSY-спектра 0,01 М раствора пептида (II) в диоксане- $d_6$  при 30° С. Пунктирной линией обозначены связи ССВ в спиновой системе протонов  $C^\alpha H-C^\beta H(C^H H_3)_2$  остатка *D*-Val<sup>4</sup>. Указано также отнесение кросс-пиков от протонов  $H-C^\alpha-C^\beta-H$  остатков Val<sup>1,3</sup>, Trp<sup>5,7,9,11</sup>, *D*-Leu<sup>6,8,10</sup> и протонов  $H-C^\alpha-H$  С-концевой группы этаноламида

Оверхаузера (ЯЭО) (NOESY-спектр, см. рис. 6) между протонами N1-H и C7-H аналогично [13]. Затем протоны индольных групп были связаны со спиновыми системами протонов  $NH-C^\alpha H-C^\beta H_2$  соответствующих триптофановых остатков с помощью ЯЭО между протонами C2-H и C4-H и протонами  $C^\beta H_2$  (рис. 7).

Таким образом, после первого этапа анализа в соответствии с аминокислотным составом пептида (II) в COSY-, 2QT- и NOESY-спектрах полностью идентифицированы химические сдвиги сигналов спиновых систем всех аминокислотных остатков (табл. 1).

Отнесение сигналов к определенному положению аминокислотных остатков в первичной структуре выполнено при анализе  $d_1$ -,  $d_2$ - и  $d_3$ -связей, отвечающих ЯЭО между протонами NH данного остатка и соответственно протонами  $C^\alpha H$ , NH и  $C^\beta H$  предыдущего по аминокислотной последовательности остатка. В условиях, исключающих спиновую диффузию ( $\tau_m$  120 мс), все остатки от С-концевой этаноламидной группы до Val<sup>8</sup> обнаруживают в NOESY-спектре  $d_1$ -связи (рис. 8 и 9), тогда как  $d_2$ -связи отсутствуют, а  $d_3$ -связи наблюдаются только в трех случаях (табл. 2). Следует, однако, отметить, что идентификация в NOESY-спектре  $d_1$ -связей во фрагменте *D*-Leu<sup>8</sup>-Trp<sup>9</sup>-*D*-Leu<sup>10</sup>-Trp<sup>11</sup> (рис. 8) не является достаточно надежной, поскольку химические сдвиги сигналов от протонов NH остатков Trp<sup>11</sup>, *D*-Leu<sup>10</sup> и Trp<sup>9</sup> близки, а химические сдвиги протонов  $C^\alpha H$  остатков *D*-Leu<sup>10</sup> и *D*-Leu<sup>8</sup> совпадают (табл. 1). Это приводит к тому, что кросс-

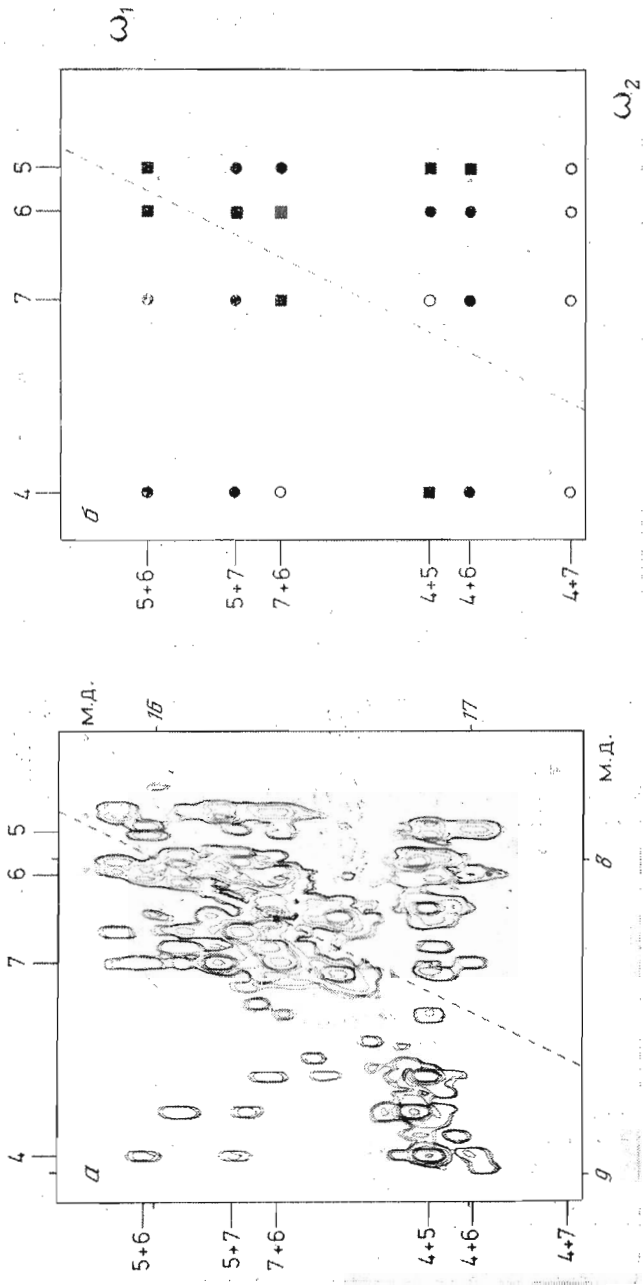


Рис. 5. *a* — ароматическая область 2Q-спектра  $\omega_1$  15,70—17,36 м. д.,  $\omega_2$  7,6—9,1 м. д. пептида (11) (фрагмент спектра рис. 4). Отнесение химических сдвигов сигналов от протонов С4-Н, С5-Н, С6-Н и С7-Н вдоль оси группы остатка Триг<sup>5</sup> указаны в верхней части рисунка соответственно цифрами 4, 5, 6 и 7. Слева вдоль оси  $\omega_1$  указаны химические сдвиги двухквантовой когерентности  $\omega_{с4-н} + \omega_{ст-н}(4+7)$ ,  $\omega_{с4-н} + \omega_{с6-н}(4+6)$  и т. д.; *б* — схематическое изображение 2Q-спектра протонов индольного кольца остатка Триг: черный квадрат — интенсивный кросс-пик, черный кружок — малоинтенсивный кросс-пик, светлый кружок — кросс-пик не наблюдается

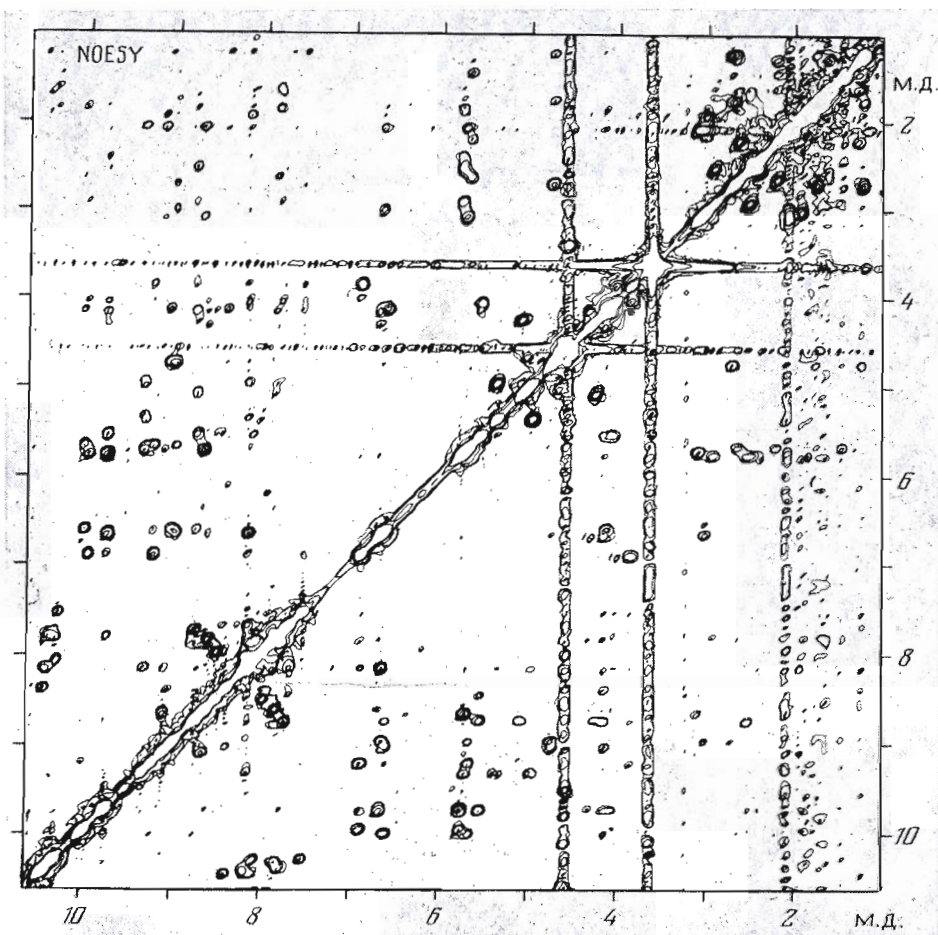


Рис. 6. NOESY-спектр 0,01 М раствора пептида (II) в диоксане- $d_8$  при 30°С. Время обмена компонент намагниченности  $\tau_m$  120 мс

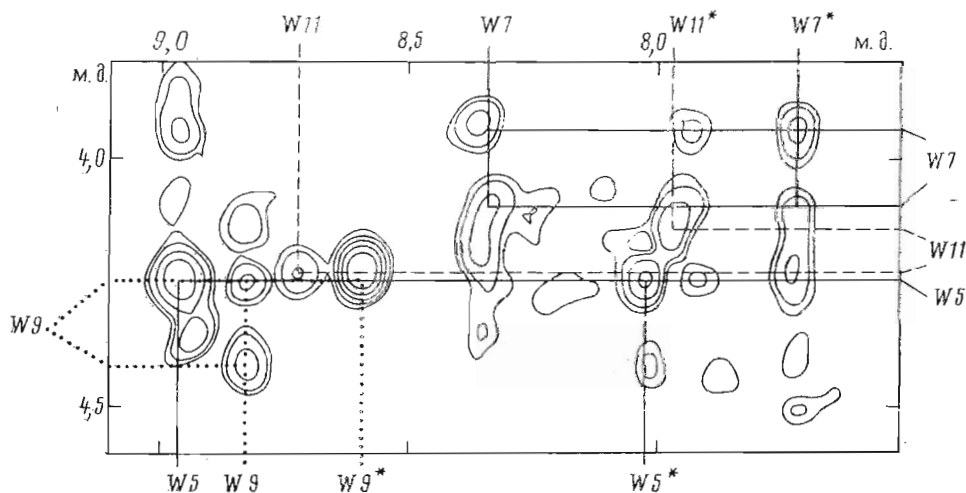


Рис. 7. Спектральная область  $\omega_1$  3,8–4,6 м. д.,  $\omega_2$  7,5–9,1 м. д. NOESY-спектра (рис. 6) пептида (II). Показано отнесение кросс-пиков ЯЭО между протонами  $C^{\beta}H_2$  и протонами  $C^{\alpha}H$  и  $C^{\gamma}H$  индольных групп остатков  $Trp^{5, 7, 9, 11}$ . Химические сдвиги протонов  $C^{\beta}H$  указаны на полях диаграммы справа и слева, а протонов  $C^{\alpha}H$  (отмечен звездочкой) и  $C^{\gamma}H$  – на полях внизу и вверху диаграммы

Константы спин-спинового взаимодействия протонов  $\text{des-(Ala}^3\text{-D-Val}^6\text{)-[Val}^1\text{]грамицидина А}$  при  $30^\circ\text{C}$  в диоксиде  $d_2$ , время полуобмена амидных протонов на дейтерий ( $\tau_{1/2}$ ), индуцированные  $^2\text{H}_2\text{O}$  изменения химических сдвигов сигналов амидных протонов ( $\Delta\delta$ ) и сведения о наличии  $d_3$ -связей ЯЭО

Аминокислотный остаток	Константы ССВ $^{1*}$ ,		$t_{1/2}^{2*}$ , ч	$\Delta\delta$ , м.д.	$d_3$
	H-NC $^\alpha$ -H	H-C $^\alpha$ C $^\beta$ -H			
Val <sup>1</sup>	10,3	9,8	2,5	+0,15	
Gly <sup>2</sup>	6,6; 3,7		15,4	+0,16	Нет
Val <sup>3</sup>	9,6	4,4	>100	+0,03	
D-Val <sup>4</sup>	8,8	9,5	>100	+0,05	Да
Trp <sup>5</sup>	8,8	2*	>100	-0,01	Нет
D-Leu <sup>6</sup>	5,9	10,3; 4,4	>100	-0,01	Да
Trp <sup>7</sup>	9,9	12,0; 3,3	>100	-0,04	Нет
D-Leu <sup>8</sup>	6,6	9,9; 3,7	>100	+0,02	Да
Trp <sup>9</sup>	8,8	3,6; 11,4	>100	-0,02	Нет
D-Leu <sup>10</sup>	7,4	7,4; 7,4	>100	+0,01	
Trp <sup>11</sup>	8,1	3,8; 11,8	>100	-0,02	
Этаноламидная группа			10,4	+0,27	

<sup>1\*</sup> Значения констант ССВ измерены по расщеплению мультиплетов и приведены с поправкой на полуширину линии. В ряде случаев для упрощения мультиплетности использовали двойной резонанс.

<sup>2\*</sup> Химические сдвиги двух  $\beta$ -протонов близки.

<sup>3\*</sup> Для индольных протонов NH остатков Trp<sup>5</sup>, Trp<sup>7</sup>, Trp<sup>9</sup> и Trp<sup>11</sup> времена  $t_{1/2}$  равны соответственно 1,0; 2,9; 2,8 и 1,6 ч.

$C_{i+1}^\alpha\text{H}$ . Если протоны  $C_i^\alpha\text{H}$  и  $N_{i+1}\text{H}$  пространственно обближены, то между ними в течение времени  $\tau_m$  импульсной последовательности  $90^\circ-t_1-90^\circ-\tau_m$  будет происходить обмен компонентами намагниченности. (В NOESY-спектре этот процесс приводит к появлению кросс-пика ЯЭО, соответствующего  $d_1$ -связи.) Затем с помощью дополнительной последовательности импульсов  $90^\circ-\tau-180^\circ-\tau-90^\circ$  вызывается когерентная передача намагниченности через  $J$ -связь между протонами  $N_{i+1}\text{H}$  и  $C_{i+1}^\alpha\text{H}$ . В результате происходит передача намагниченности от протона  $C_i^\alpha\text{H}$  к протону  $C_{i+1}^\alpha\text{H}$  и в NOERELSY-спектре наблюдается кросс-пик с координатами  $\omega_1 = \omega_{C_i^\alpha\text{H}}$ ,  $\omega_2 = \omega_{C_{i+1}^\alpha\text{H}}$ . Следует отметить, что NOERELSY-эксперимент не является симметричным, так как обратная передача намагниченности от протона  $C_{i+1}^\alpha\text{H}$  к протону  $C_i^\alpha\text{H}$  не происходит и соответственно кросс-пик с координатами  $\omega_1 = \omega_{C_{i+1}^\alpha\text{H}}$ ,  $\omega_2 = \omega_{C_i^\alpha\text{H}}$  в спектре не наблюдается. На рис. 9 показана область сигналов протонов  $C^\alpha\text{H}$  в NOERELSY-спектре пептида (II) и указано отнесение кросс-пиков, отвечающих последовательным ЯЭО- и  $J$ -связям между протонами  $C^\alpha\text{H}$  соседних по аминокислотной последовательности остатков. Этот эксперимент подтверждает наличие  $d_1$ -связей между протонами  $N_{i+1}\text{H}$  и  $C_i^\alpha\text{H}$  пептида (II) и завершает отнесение сигналов к определенным остаткам в аминокислотной последовательности.

*Пространственная структура.* Следующим этапом конформационного ЯМР-анализа является построение пространственной структуры молекулы на основе анализа констант ССВ протонов, скорости дейтерообмена амидных водородов и ЯЭО между протонами. Большинство констант ССВ вицинальных протонов H-NC $^\alpha$ -H и H-C $^\alpha$ C $^\beta$ -H измерено непосредственно в одномерных  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектрах по расщеплению сигналов от протонов NH, C $^\alpha$ H и C $^\beta$ H. Константы ССВ протонов H-NC $^\alpha$ -H для остатков Trp<sup>9</sup>, Trp<sup>11</sup> и D-Leu<sup>10</sup>, химические сдвиги сигналов от протонов NH которых практи-



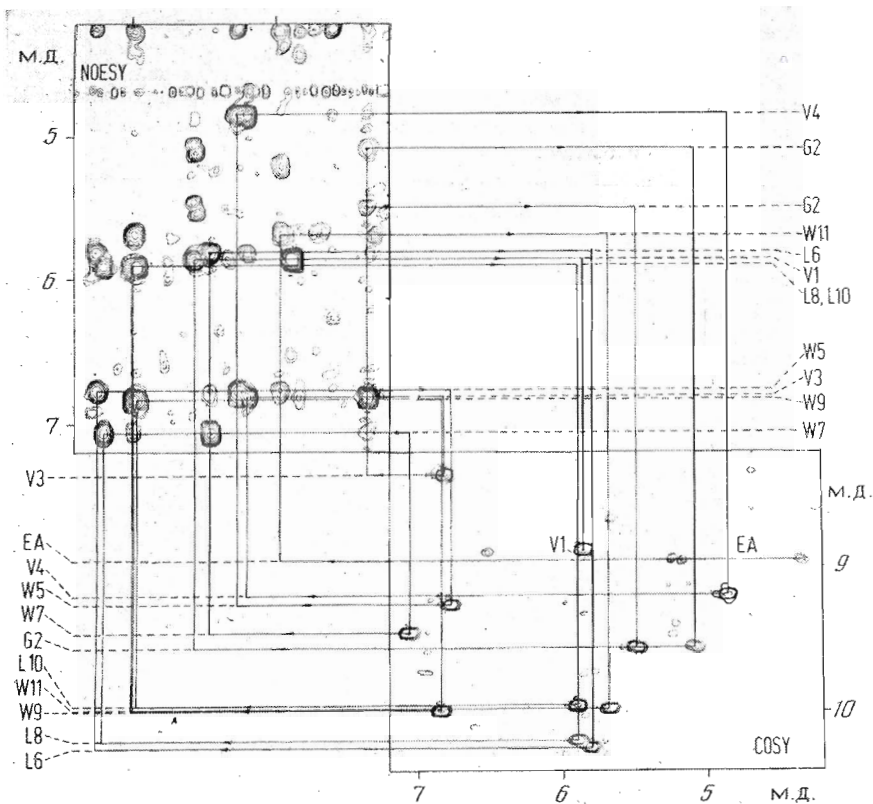


Рис. 8. Комбинированная COSY-NOESY-диаграмма для последовательного отнесения сигналов при помощи ЯЭО между протонами  $N_{i+1}H$  и  $C_i^{\alpha}H$  (NOESY-спектр) и скалярных ССВ между протонами  $N_iH$  и  $C_iH$  (COSY-спектр). В верхнем левом квадрате расположена область  $\omega_1$  4,2–7,2 м. д.,  $\omega_2$  8,2–10,4 м. д. NOESY-спектра (см. рис. 6) 0,01 М раствора (II) в диоксане- $d_8$  (30° С, время обмена компонент намагниченности 120 мс), в правом нижнем квадрате – область  $\omega_1$  8,2–10,4 м. д.,  $\omega_2$  4,2–7,2 м. д. COSY-спектра, полученного для того же образца при идентичных условиях в совмещенном COSY-NOESY-эксперименте. Прямые линии со стрелками указывают  $d_1$ -связи между соседними остатками и скалярные ССВ внутри остатков от этаноламидной группы до Val<sup>1</sup>. Отнесение химических сдвигов амидных протонов к аминокислотным остаткам указано в левом нижнем квадрате диаграммы, а для протонов  $C^{\alpha}H$  – в правом верхнем квадрате соответственно

чески совпадают во всем исследованном диапазоне температур от 25 до 80° С, измерены по фазоизбирательному COSY-спектру (рис. 2), как описано в работе [15]. Сравнение значений констант ССВ  $H-NC^{\alpha}-H$ , полученных из одномерных  $^1H$ -ЯМР-спектров и двумерного фазоизбирательного COSY-спектра, показало, что оба метода дают одинаковые результаты в пределах погрешности измерения  $\pm 0,5$  Гц (табл. 2).

Чтобы определить доступность амидных групп пептида (II) для молекул растворителя, к раствору в диоксане- $d_8$  добавлено 3%  $^2H_2O$  и в течение 48 ч измерена скорость дейтерообмена (рис. 1, табл. 2). Наблюдаемое при этом смещение (0,27–0,15 м.д., см. табл. 2) в слабое поле сигналов от амидных протонов остатков Val<sup>1</sup> и Gly<sup>2</sup>, а также этаноламидной группы означает, что либо эти амидные группы NH, либо карбонильные группы соответствующих пептидных связей  $NN-CO$  доступны для контакта с молекулами растворителя. Эти индуцированные водой сдвиги и измеренные скорости дейтерообмена амидных водородов (табл. 2) указывают на то, что NH-группы Val<sup>1</sup> и этаноламидной группы, а также карбонильная группа остатка Val<sup>1</sup> экспонированы в растворитель. Все остальные амидные и карбонильные группы молекулы пептида (II), очевидно, экранированы от растворителя и принимают участие в образовании системы водородных связей в димере пептида (II).

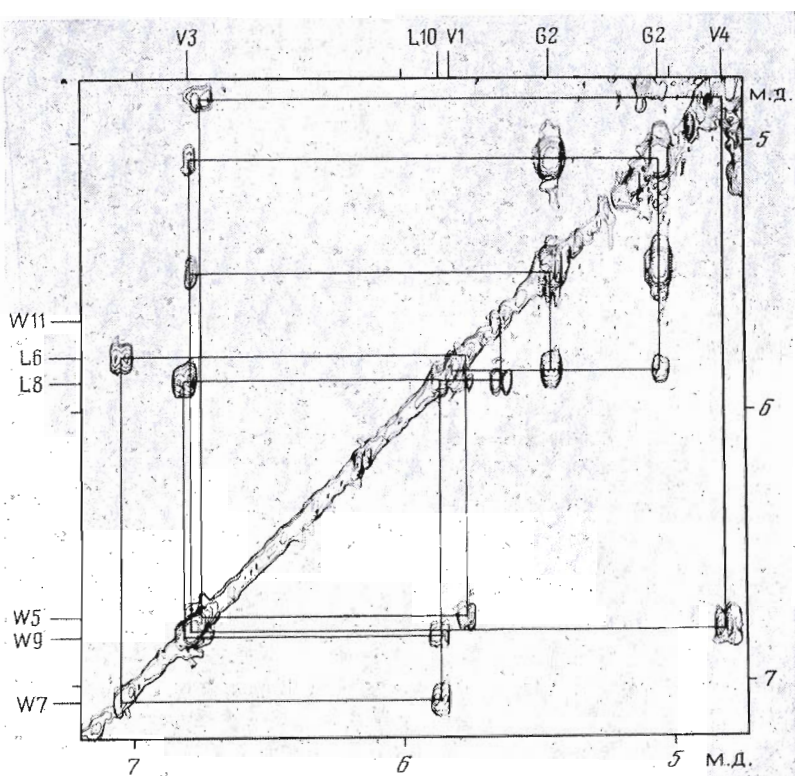


Рис. 9. Область  $\delta$  4,7–7,2 м.д. NOERELSY-спектра 0,01 М раствора пептида (II) в диоксане- $d_2$  при 30° С. Линиями соединены кросс-пики, соответствующие ЯЭО-ССВ-связям между протонами  $C^\alpha H$  соседних по аминокислотной последовательности остатков от Val<sup>1</sup> до Trp<sup>11</sup>. Отнесение химических сдвигов указано на полях контурной карты

Основные сведения о пространственной структуре молекулы получены при анализе NOESY-спектра, в результате которого обнаружены свыше 40 ЯЭО-взаимодействий между протонами, не принадлежащих соседним по аминокислотной последовательности остаткам. На рис. 10 показано отнесение в NOESY-спектре кросс-пигов ЯЭО между протонами NH и  $C^\alpha H$  основной цепи. При рассмотрении этих данных обращает на себя внимание периодичность ЯЭО-контактов — амидный протон  $i$ -го остатка пространственно сближен с протонам  $C^\alpha H$   $i+2$ -го остатка (для четных  $i$ ) или с  $C^\alpha H$ -протоном  $i-2$ -го остатка (для нечетных  $i$ ).

Для согласования полученных данных необходимо иметь в виду, что параметры ЯМР, характеризующие локальную конформацию аминокислотных остатков (углы  $\phi$  и  $\psi$ ), а именно значения констант ССВ протонов  $H-NC^\alpha-H$  (табл. 2), наличие  $d_1$ -связей (рис. 8 и 9) и отсутствие  $d_2$ -связей, свидетельствуют о развернутой конформации основной цепи пептида (II). Следовательно, отмеченные выше ЯЭО между протонами NH и  $C^\alpha H$  не могут быть реализованы внутри одной основной цепи и представляют собой проявление контактов между пространственно сближенными протонами двух основных цепей димера пептида (II). Для того чтобы удовлетворять всем наблюдаемым ЯЭО-контактам, две вытянутые основные цепи должны быть расположены параллельно (рис. 11). Однако в такой структуре образуется только часть водородных связей и в димере отсутствуют элементы симметрии, что противоречит гомогенности спектра ЯМР. Поскольку каждому химически эквивалентному протону димерной формы пептида (II) соответствует только один сигнал ЯМР, эти протоны должны находиться в одинаковом пространственном окружении, т. е. димерная структура должна иметь ось симметрии  $C_2$ . Кроме того, согласно приведенным выше данным, в водородных связях не участвует только

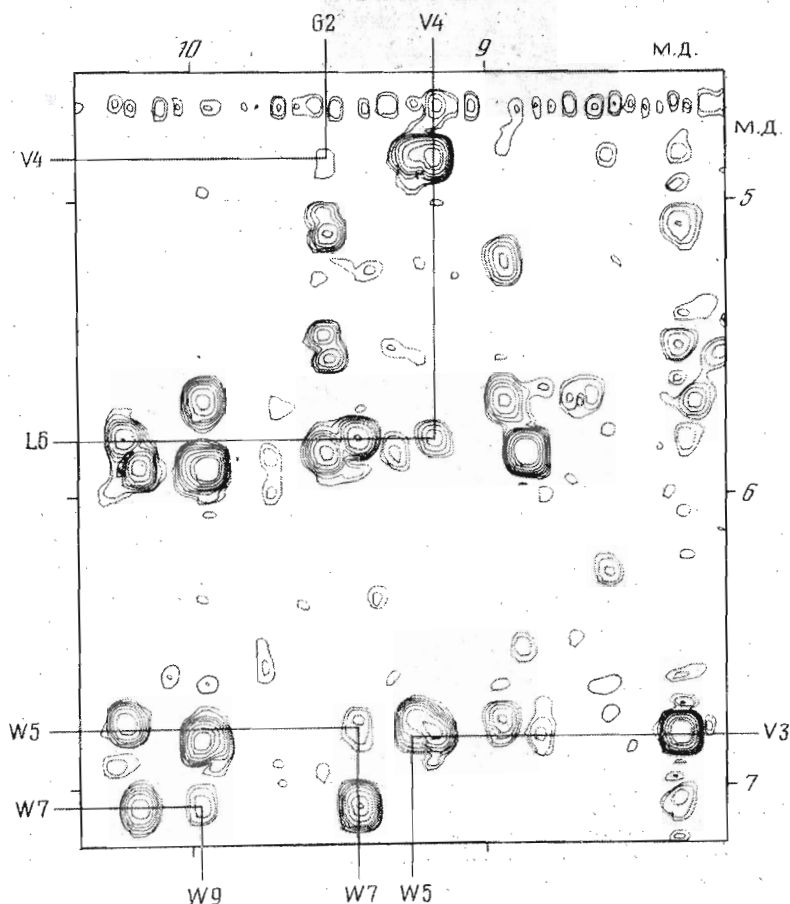


Рис. 10. Спектральная область  $\omega_1$  4,6–7,2 м. д.,  $\omega_2$  8,2–10,4 м. д. NOESY-спектра (см. рис. 6) пептида (II) в диоксане- $d_8$  при 30° С. Время обмена компонент намагниченности 120 мс. На полях диаграммы указано отнесение химических сдвигов сигналов от протонов NH (вверху и внизу) и протонов  $C^2H$  (слева и справа)

карбонильная группа остатка Val<sup>1</sup> и амидные группы остатка Val<sup>1</sup> и С-концевой этаноламидной группы. Чтобы удовлетворить всем требованиям, две параллельные цепи пептида (II) должны быть свернуты (рис. 12) в правую двойную спираль, имеющую 5,6 остатка на виток.

Приведенный выше анализ конформации пептида (II) основывался на выводе [9] о димерной структуре молекулы. Для проверки этого вывода измерено малоугловое рассеяние рентгеновских лучей пептида (II) в диоксане при 20° С на установке с позиционно-чувствительным детектором [16]. Найденный при этом радиус инерции молекулы  $R_g = 8,4 \pm 0,1$  Å согласуется с рассчитанным исходя из размеров молекулярной модели правой параллельной двойной  $\uparrow\uparrow\text{лл}^{LD}$ -спирали пептида (II) (рис. 12), которую можно аппроксимировать прямым круглым цилиндром высотой ( $H$ ) 25 Å и радиусом внешней поверхности ( $R$ ) 7 Å ( $R_g = (R^2/2 + H^2/12)^{1/2} = 8,8$  Å).

Таким образом, с помощью конформационного ЯМР-анализа показано, что пространственная структура димера des-(Ala<sup>3</sup>-D-Val<sup>6</sup>)-[Val<sup>1</sup>]грамицидина А (II) в диоксане представляет собой правую параллельную двойную спираль с 5,6 остатка на виток ( $\uparrow\uparrow\text{лл}^{5,6}$ ). Этот тип двойной спирали, гипотетически рассмотренный в работе [6] для полипептидов с чередующимися *L*- и *D*-аминокислотными остатками, впервые нашел экспериментальное подтверждение в настоящей работе.

Полученный результат не согласуется с выводами работы [9], в которой димеру пептида (II) в диоксане приписывается структура правой ап-

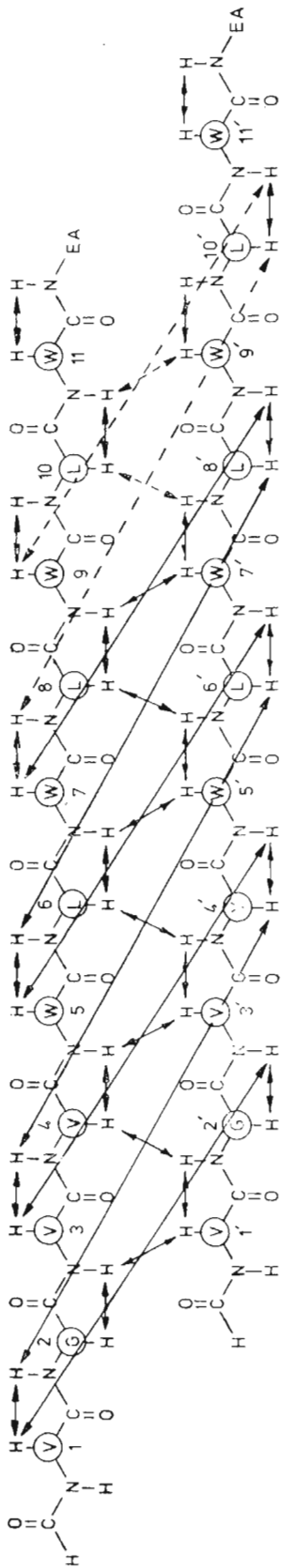


Рис. 11

Рис. 11. Схема ЯЭО-контактов между протонами двух основных цепей димерной формы пептида (II). Сплошные линии со стрелками – ЯЭО-контакты, идентифицированные в NOESY-спектре; штриховые линии со стрелками – ЯЭО-контакты, которые, согласно молекулярной модели, должны наблюдаться в NOESY-спектре, но не были идентифицированы, так как соответствующие кросс-пики находятся в перекрытых областях 2D-спектра. EA – этапом-ламин

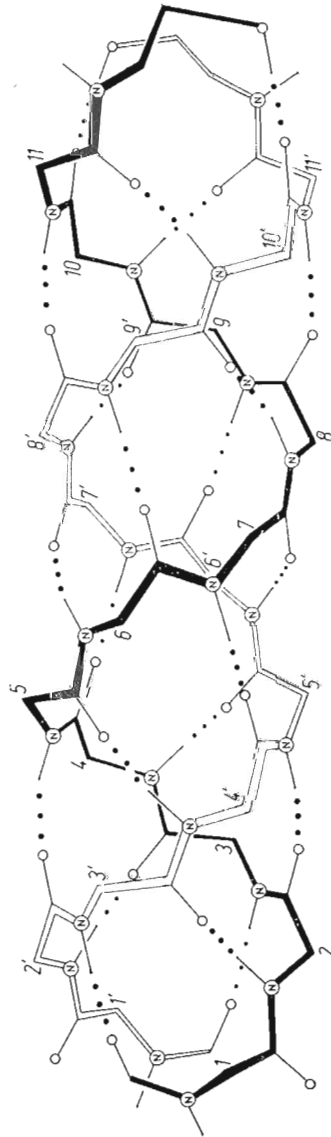


Рис. 12

Рис. 12. Схематическое изображение конформации правой параллельной двойной  $\uparrow\uparrow\uparrow_{L,D}^{5,6}$ -спирали пептида (II). Боковые цепи аминокислотных остатков не показаны. Три точки не отмечены водородные связи

типараллельной двойной спирали  $\uparrow\downarrow\text{пл}_{LD}^{\zeta}$ . Измеренная частота Амид I  $1637 \text{ см}^{-1}$  значительно отличается от рассчитанной для  $\uparrow\downarrow\text{пл}_{LD}^{5,6}$ -спирали 11-членного аналога грамицидина А ( $1652 \text{ см}^{-1}$ ). Причины этого различия неясны. Одно из возможных объяснений сводится к следующему. Вывод работы [9] о присутствии спирали  $\uparrow\downarrow\text{пл}_{LD}^{5,6}$  в растворе пептида (II) основан главным образом на сопоставлении экспериментального ИК-спектра с рассчитанным исходя из атомных координат, полученных [8] методами теоретического конформационного анализа. Согласно этому расчету, углы  $\varphi$  для остатков *L*-аминокислот в правых спиральных  $\uparrow\downarrow\text{пл}_{LD}^{5,6}$  составляют  $-117^\circ$ , а для *D*-остатков  $-144^\circ$ . Это соответствует константам ССВ 9,0–10,5 Гц для *L*-остатков и 8,2–9,5 Гц для *D*-остатков [17]. Измеренные же в настоящей работе значения констант заметно различаются: 8,1–10,3 Гц для *L*-остатков и 5,9–8,8 Гц для *D*-остатков (табл. 2), что свидетельствует об отклонении теоретической  $\uparrow\downarrow\text{пл}$ -спирали от фактически реализуемой. Это может быть причиной упомянутого выше несоответствия экспериментальных и расчетных ИК-частот. Чувствительность ИК-частот к сравнительно небольшим изменениям углов  $\varphi$ ,  $\psi$  в спиральной структуре недавно продемонстрирована на примере  $\alpha$ -спирали [18].

Структурные свойства  $\uparrow\downarrow\text{пл}_{LD}^{5,6}$ -спирали, такие, как диаметр аксиальной полости  $\sim 3 \text{ \AA}$ , гидрофобная внешняя поверхность, в принципе удовлетворяют требованиям, предъявляемым к структуре трансмембранного канала. Частоты полосы Амид I димерной формы пептида (II) в растворе диоксана ( $1637 \text{ см}^{-1}$ ) [9] и грамицидина А, встроенного в липосомы при низком соотношении пептид/липид ( $1634 \text{ см}^{-1}$ ) [19, 20], близки. Спектры КД пептида (II) в растворе диоксана [9] и грамицидина А, встроенного в липосомы [19, 20], имеют положительный знак эффекта Коттона, но формы спектров различаются. Несмотря на это, правую  $\uparrow\downarrow\text{пл}_{LD}^{5,6}$ , а также экспериментально обнаруженную ранее  $\uparrow\downarrow\text{пл}_{LD}^{5,6}$ -спираль [10, 11] грамицидина А можно рассматривать в качестве возможной структуры трансмембранного канала.

В заключение отметим, что в недавних работах Урри и сопр. [2, 21] настаивают на односторонней димерной форме типа  $\text{пл}_{LD}\text{пл}_{LD}$ -спирали как единственной структуре грамицидинового канала, согласующейся с полученными экспериментальными данными. Мы считаем такой вывод преждевременным, поскольку упомянутые данные были получены при высоких соотношениях грамицидин/липид, соответствующих более высокомолекулярным, чем димер, ассоциатам антибиотика.

### Экспериментальная часть

Синтез  $\text{des}-(\text{Ala}^3\text{-D-Val}^6)\text{-[Val}^1\text{]грамицидина А (II)}$  описан в работе [22].

Спектры  $^1\text{H-NMR}$  получены на спектрометре с рабочей частотой 500 МГц типа Bruker WM-500, оснащенном ЭВМ Aspect 2000. Спектры 0,005–0,2 М растворов пептида (II) в диоксане- $d_8$  (99% дейтерия, Stohler Isotope Chemicals) снимали в 5-мм ампуле при  $30^\circ \text{ C}$ .

COSY- и NOESY-спектры были получены в совмещенном эксперименте с помощью последовательности неселективных  $90^\circ$ -градусных импульсов [23]:

$$(90^\circ - t_1 - 90^\circ - t_2^C - \Delta - 90^\circ - t_2^N)_n, \quad (1)$$

где  $t_1$  — период эволюции,  $t_2^C$  и  $t_2^N$  — периоды наблюдения сигнала соответственно для COSY- и NOESY-спектров. Время смешивания компонентов намагниченности NOESY-спектра  $\tau_m = t_2^C + \Delta$ . Для получения двумерных спектров измерения повторены для 512 эквидистантных значений  $t_1$ , лежащих в диапазоне 0,1–51,2 мс с шагом 0,1 мс;  $t_2^C = t_2^N = 102,4 \text{ мс}$ ,  $\tau_m = 120 \text{ мс}$ . Здесь и далее в каждом эксперименте перед началом очередной

серии импульсов следовал временной интервал 1,2 с для достижения равновесного состояния ядерной намагниченности. Для улучшения соотношения сигнал/шум импульсная последовательность повторялась  $n$  раз. Спектры получены накоплением в течение 23 ч.

NOERELSY-спектр получен в эксперименте с помощью последовательности неселективных импульсов [14]:

$$(90^\circ - t_1 - 90^\circ - \tau_m - 90^\circ - \tau - 180^\circ - \tau - 90^\circ - t_2)_n, \quad (2)$$

где  $t_1$  — период эволюции, во время которого компоненты намагниченности частотно метаются;  $\tau_m$  — время смешивания компонентов намагниченности, в течение которого кросс-релаксация приводит к некогерентному обмену намагниченностями между пространственно сближенными протонами (ИЭО). Фрагмент указанной последовательности  $90^\circ - \tau - 180^\circ - \tau - 90^\circ$  индуцирует когерентную передачу намагниченности между протонами, связанными скалярным спин-спиновым взаимодействием. Эффективность этой передачи определяется значениями констант ССВ протонов спиновой системы и временем  $\tau$  [24]. Для получения спектра, показанного на рис. 9, использовано 512 эквидистантных значений  $t_1$ , лежащих в диапазоне 0,1–51,2 мс с шагом 0,1 мс,  $\tau_m = 150$  мс,  $\tau = 25$  мс,  $t_2 = 102,4$  мс.

2QT-спектр получен в эксперименте с помощью последовательности неселективных импульсов [12]:

$$(90^\circ - \tau - 180^\circ - \tau - 90^\circ - t_1 - 90^\circ - t_2)_n. \quad (3)$$

Фрагмент этой последовательности  $(90^\circ - \tau - 180^\circ - \tau - 90^\circ)$  возбуждает в системе связанных спин-спиновым взаимодействием протонов двухквантовую когерентность. Для двухспиновой системы, например, двухквантовая когерентность возбуждается оптимальным образом, если  $\tau = 1/4J$  [12]. В течение времени эволюции  $t_1$  компоненты намагниченности, соответствующие двухквантовой когерентности, приобретают зависимость от частоты резонансного перехода. Третий, 90-градусный импульс вызывает передачу двухквантовой когерентности на одноквантовую, которая регистрируется как функция времени  $t_2$ . Затем эксперимент повторяют для эквидистантных значений  $t_1$ . Для получения 2QT-спектра использовано 1024 значения  $t_1$ , лежащих в диапазоне 0,009–46 мс с шагом 0,05 мс;  $\tau = 25$  мс,  $t_2 = 102,4$  мс.

Преобразование Фурье COSY-, NOESY-, NOERELSY- и 2QT-спектров выполнено с помощью программы Bruker FTNMR 2D, версия 82061.6, как в работе [25].

Фазоизбирательный COSY-спектр получен с помощью последовательности неселективных 90-градусных импульсов, как в работе [15]:  $(90^\circ - t_1 - 90^\circ - t_2)$ . Для получения двумерных спектров эксперимент повторен для 1024 эквидистантных значений  $t_1$ , лежащих в диапазоне 0,009–102,4 мс с шагом 0,1 мс. Время наблюдения сигнала ( $t_2$ ) равно 409,6 мс. Преобразование Фурье для получения фазоизбирательного спектра выполнено с помощью специально модифицированной нами версии программы Bruker FTNMR2D. Матрица данных во временной области дополнялась нулями таким образом, чтобы после преобразования цифровое разрешение составляло 0,76 и 2,44 Гц на точку для  $\omega_2$  и  $\omega_1$ -направлений соответственно. Авторы выражают благодарность д-ру Г. Вагнеру (Цюрих, Швейцария) за программу для получения NOERELSY-спектра и Л. А. Фейгину (Институт кристаллографии им. А. В. Шубникова АН СССР) за помощь в измерении радиуса инерции пептида (II).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ovchinnikov Yu. A., Ivanov V. T. In: Conformation in Biology/Eds Srinivasan R., Sarma R. H. N. Y.: Acad. Press, 1982, p. 155–174.
2. Urry D. W., Trapane T. L., Prasad K. U. Science, 1983, v. 221, № 4615, p. 1064–1067.
3. Veitch W. R., Stryer L. J. Mol. Biol., 1977, v. 113, № 1, p. 89–102.
4. Urry D. W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, v. 68, № 3, p. 672–676.
5. Ramachandran G. N., Chandrasekaran R. Ind. J. Biochem. and Biophys., 1972, v. 9, № 1, p. 1–11.

6. Veatch W. R., Fossel E. T., Blout E. R. *Biochemistry*, 1974, v. 13, № 26, p. 5249–5256.
7. Lotz B., Colonna-Cesari F., Heitz F., Spach G. J. *Mol. Biol.*, 1976, v. 106, № 4, p. 915–942.
8. Colonna-Cesari F., Premilat S., Heitz F., Spach G., Lotz B. *Macromolecules*, 1977, v. 10, № 5, p. 1284–1288.
9. Sychev S. V., Nevskaya N. A., Jordanov St., Shepel E. N., Miroshnikov A. I., Ivanov V. T. *Bioorgan. Chem.*, 1980, v. 9, № 1, p. 121–151.
10. Arseniev A. S., Bystrov V. F., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. *FEBS Lett.*, 1984, v. 165, № 1, p. 51–56.
11. Арсеньев А. С., Барсуков И. Л., Сычев С. В., Быстров В. Ф., Иванов В. Т., Овчинников Ю. А. *Биол. мембраны*, 1984, т. 1, с. 5–17.
12. Braunschweiler L., Bodenhausen G., Ernst R. R. *Mol. Phys.*, 1983, v. 48, № 3, p. 535–560.
13. Arseniev A. S., Wieder G., Joubert F. J., Wuthrich K. J. *Mol. Biol.*, 1982, v. 159, № 2, p. 323–351.
14. Wagner G. Abstracts of III Soviet-Swiss symposium «Biological Membranes: Structure and Function». Tashkent, 1983, p. 18.
15. Marion D., Wuthrich K. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1983, v. 113, № 3, p. 967–974.
16. Могилевский Л. Ю., Дембо А. Т., Свєргун Д. И., Фейгин Л. А. *Кристаллография*, 1984, т. 29, № 3, с. 587–591.
17. Bystrov V. F. In: *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy*, 1976, v. 10, p. 41–81.
18. Krimm S., Dwivedi A. M. *Science*, 1982, v. 216, № 4544, p. 407–408.
19. Sychev S. V., Ivanov V. T. In: *Membranes and transport*/Ed. Martonosi A. N. N. Y.: Plenum Corp., 1982, v. 2, p. 301–307.
20. Ivanov V. T., Sychev S. V. In: *Peptides (Proc. VIII Amer. Pept. Symp.)*/Ed. Hrubby V. Rockford: Pierce Chem. Comp., 1984.
21. Urry D. W., Shaw R. G., Trapani T. L., Prasad K. U. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1983, v. 114, № 1, p. 373–379.
22. Шепель Е. Н., Иорданов Ст., Рябова И. Д., Мирошников А. И., Иванов В. Т., Овчинников Ю. А. *Биооргани. химия*, 1976, т. 2, № 5, с. 581–593.
23. Garevich A. Z., Barsukov I. L., Arseniev A. S., Bystrov V. F. *J. Magn. Reson.*, 1984, v. 56, № 3, p. 471–478.
24. Sorensen O. W., Eich G. W., Levitt M. H., Bodenhausen G., Ernst R. R. In: *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy*, 1983, v. 16, p. 163–192.
25. Арсеньев А. С., Кондаков В. И., Майоров В. Н., Волкова Т. М., Гришин Е. В., Быстров В. Ф., Овчинников Ю. А. *Биооргани. химия*, 1983, т. 9, № 6, с. 768–793.

Поступила в редакцию  
4.V.1984

## 2D <sup>1</sup>H NMR CONFORMATIONAL ANALYSIS OF DES-(ALA<sup>3</sup>-D-VAL<sup>6</sup>)-[VAL<sup>1</sup>] GRAMICIDIN A IN SOLUTION: THE RIGHT-HANDED PARALLEL DOUBLE HELIX

ARSENIYEV A. S., BARSUKOV I. L., SHEPEL E. N.,  
BYSTROV V. F., IVANOV V. T.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow*

Two-dimensional <sup>1</sup>H NMR spectra (COSY, 2QT, NOESY and NOERELSY) of des-(Ala<sup>3</sup>-D-Val<sup>6</sup>)-[Val<sup>1</sup>]gramicidin A have been studied in dioxane solution. Complete unambiguous assignments of proton signals have been accomplished. The analysis of nuclear Overhauser effects for the protons of neighboring or distant residues in the amino acid sequence, spin-spin coupling of the vicinal H-NC<sup>α</sup>-H protons and deuterium exchange rates for individual amide hydrogens have allowed the elucidation of the backbone conformation of the molecule. It represents the right-handed  $\uparrow\uparrow\pi_{LD}^{5,6}$  double helix with 5,6 residues per turn. The structural parameters of this double helix are in accord with requirements of the gramicidin A transmembrane channel.