



УДК 577.322.5 : 543.422.25

**ИССЛЕДОВАНИЕ КОНФОРМАЦИОННОГО СОСТОЯНИЯ
БРАДИКИНИНА В РАСТВОРЕ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА
МЕТОДАМИ ДВУМЕРНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ¹H-ЯМР***Саултис Ю. В., Лиетиньш Э. Э., Секацис И. П.,
Мутулис Ф. К., Мутуле И. Э., Чипенс Г. И.**Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига*

Для выявления роли разноименно заряженных групп в стабилизации конформации брадикинина изучены состояния молекулы в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ — с протонированной и депротонированной С-концевой карбоксильной группой. Анализом двумерных COSY- и NOESY-спектров сделано отнесение сигналов ¹H-ЯМР брадикинина. Обнаружено изменение химических сдвигов сигналов протонов NH и C^αH остатков Arg¹ и Arg⁹, температурных коэффициентов химических сдвигов амидных протонов, констант спин-спинового взаимодействия и появление дополнительных d_{αN}- и d_{βN}-связей в NOESY-спектре при протонировании С-концевой карбоксильной группы.

Экспериментальные данные хорошо согласуются с предположением о стабилизации конформации пептида электростатическим взаимодействием между разноименно заряженными N- и С-концевыми группами в растворе $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$. Предполагается, что конформация молекулы с депротонированной карбоксильной группой характеризуется двумя β-изгибами в последовательностях Pro²-Pro-Gly-Phe⁶ и Ser⁶-Pro-Phe-Arg⁹.

Пептидный гормон брадикинин Arg¹-Pro²-Pro³-Gly⁴-Phe⁵-Ser⁶-Pro⁷-Phe⁸-Arg⁹ в течение последних лет является объектом интенсивного исследования. Это связано с широким спектром его физиологической активности [1]. Рецепторы брадикинина расположены в разных тканях организма (органы, имеющие гладкую мускулатуру, периферическая и центральная нервная система, репродуктивная система, железы внутренней секреции, форменные элементы крови и др.). Специфичность и селективность действия брадикинина обеспечиваются строго локализованным местом его образования. Кроме того, брадикинин действует не только непосредственно, но и через высвобождение катехоламинов, простагландинов и, возможно, через другие медиаторы. Механизмы действия гормона в данный момент трудно объяснимы на молекулярном уровне, и одна из важнейших задач — выяснение для него закономерности структура—функция — в первую очередь связана с определением конформационных свойств пептидной молекулы в растворе.

Конформация брадикинина исследовалась неоднократно. Ранние работы по КД-спектроскопии полипептида ограничивались общими предположениями о множественности конформаций его молекулы [2]. Комплекс исследований, проведенных различными методами В. Т. Ивановым и соавт. [2—4], позволил сделать вывод о предпочтительности свернутых форм брадикинина в растворах воды и этанола. Это показано оценкой средних расстояний между некоторыми парами аминокислотных остатков (расстояние между остатками 1 и 8 меньше, чем между остатками 5 и 8), полученных с помощью флуоресцентного анализа и ЭПР-спектроскопии. В пользу свернутых конформаций этого гормона свидетельствуют данные ¹³C-ЯМР-спектроскопии [5]. Имеется предположение о стабилизации пространственной структуры брадикинина с помощью β-изгиба в последовательности Pro²-Pro³-Gly⁴-Phe⁵ и γ-изгиба с участием остатка Pro⁷ в последовательности Ser⁶-Pro⁷-Phe⁸ [6, 7]. Надо отметить противоречивость данных о взаимодействии разноименно заряженных групп молекулы брадикинина в водном растворе [5, 8]. На энергетическую предпочтительность

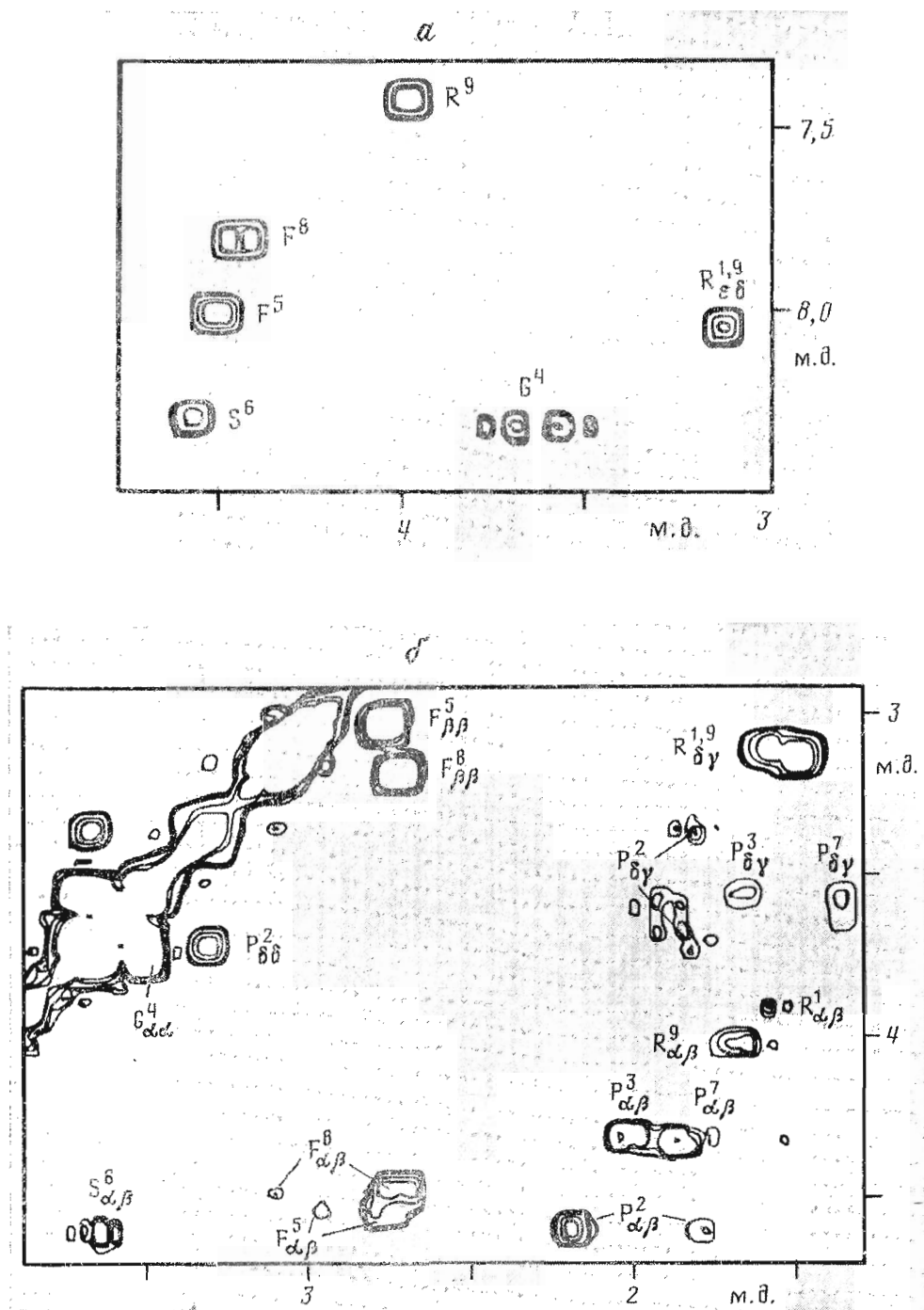


Рис. 1 а, б

свернутых конформаций указывают результаты теоретического конформационного анализа гормона [9]. Проведен теоретический конформационный анализ ряда замещенных линейных аналогов брадикинина, результаты которого, сопоставленные с биологической активностью аналогов, позволили авторам выделить биологически активные конформации молекулы [9]. Не рассматривая конкретные особенности этих структур, отметим их свернутый характер. Напротив, в работах [10, 11] на основании данных спектроскопии ЯМР сделан вывод о неупорядоченной пространственной структуре брадикинина в водном растворе.

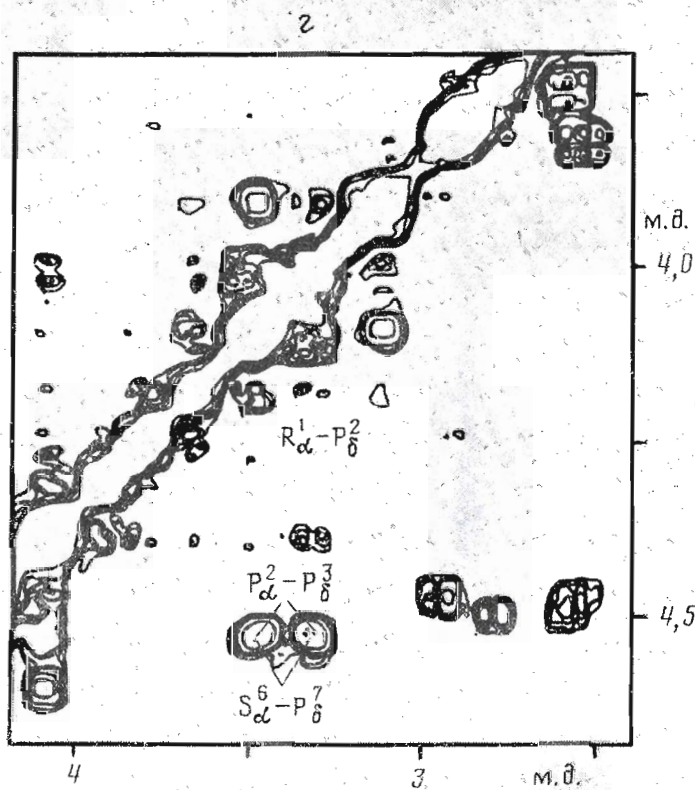
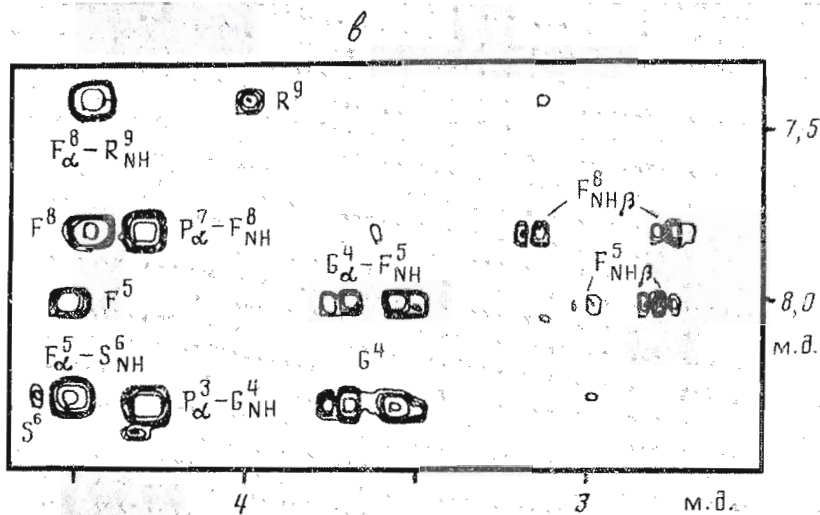


Рис. 1. COSY- и NOESY-спектры брадикинина в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ в состоянии II (лиофилизирован из водного раствора с pH 4,4). Показаны спектральные области COSY-спектра δ_1 7,4–8,5, δ_2 3,0–4,8 м. д. (а) и δ_1 2,9–4,7, δ_2 1,3–3,9 м. д. (б), а также спектральная область NOESY-спектра δ_1 7,1–8,5, δ_2 2,5–4,7 м. д. (показаны кросс-пики, соответствующие $d_{\alpha N}$ -связям) (в) и δ_1 3,4–4,8, δ_2 2,4–4,2 м. д. (г). Здесь и далее буквы и цифры указывают в однобуквенном коде отнесение сигнала к соответствующему остатку в аминокислотной последовательности (R — Arg, F — Phe, S — Ser, G — Gly, P — Pro)

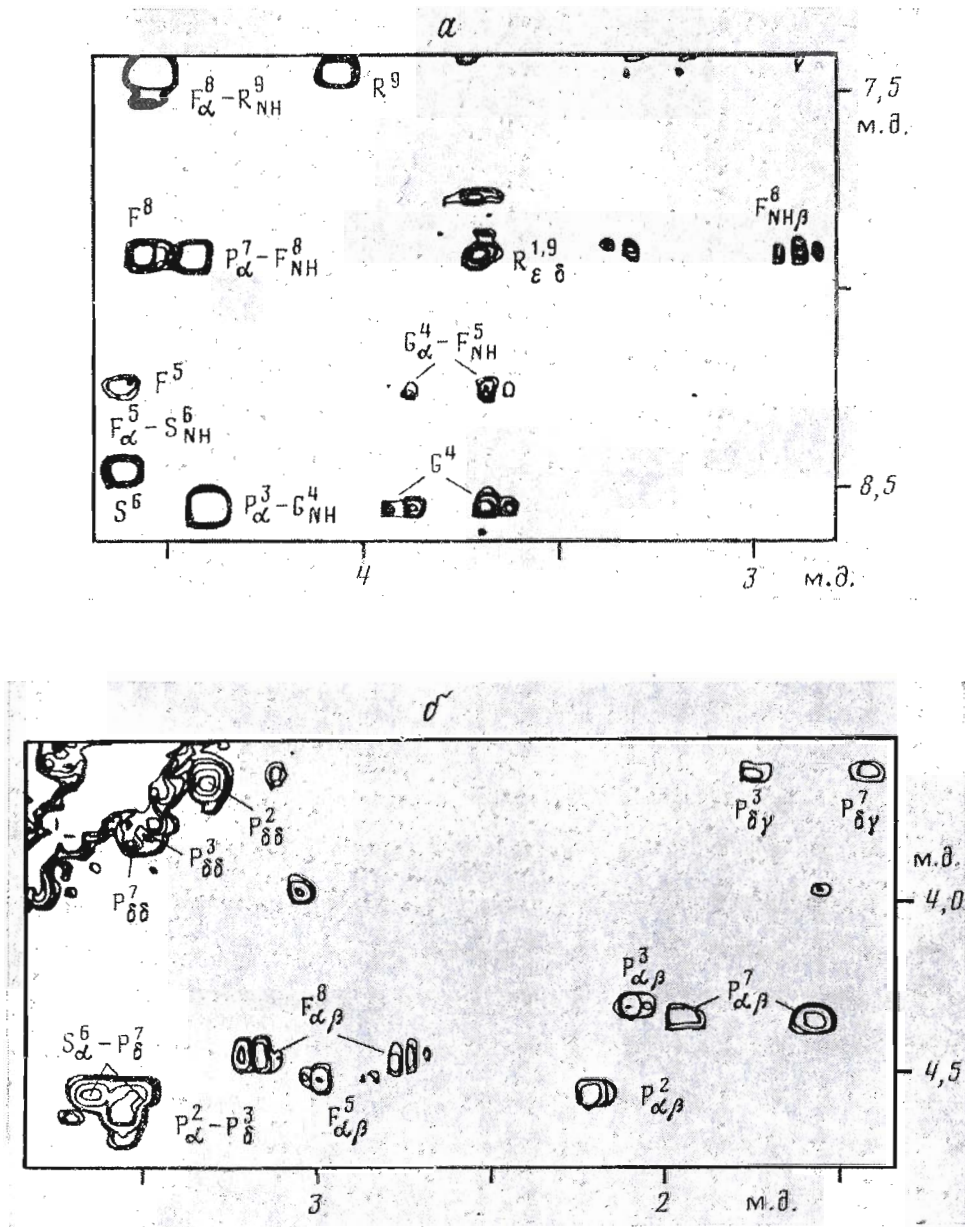


Рис. 2 а, б

Из вышесказанного видно, что представления о пространственной структуре брадикинина в растворе противоречивы. В настоящей работе проведено его исследование в диметилсульфоксиде методами двумерной (2D) ^1H -ЯМР-спектроскопии. Чтобы определить роль разноименно заряженных групп в стабилизации конформации, исследование выполнено для двух состояний молекулы — с протонированной и депротонированной С-концевой карбоксильной группой. Выбор DMSO обоснован более высокой вероятностью проявления электростатических взаимодействий в этом растворителе, чем в H_2O .

Молекула брадикинина содержит три остатка Pro, по два остатка Arg и Phe, поэтому полное отнесение сигналов спектра ^1H -ЯМР выполнено анализом COSY- и NOESY-спектров.

Двумерный метод COSY подробно описан в работах [12—14] и применительно к пептидам позволяет выделить сигналы протонов аминокис-

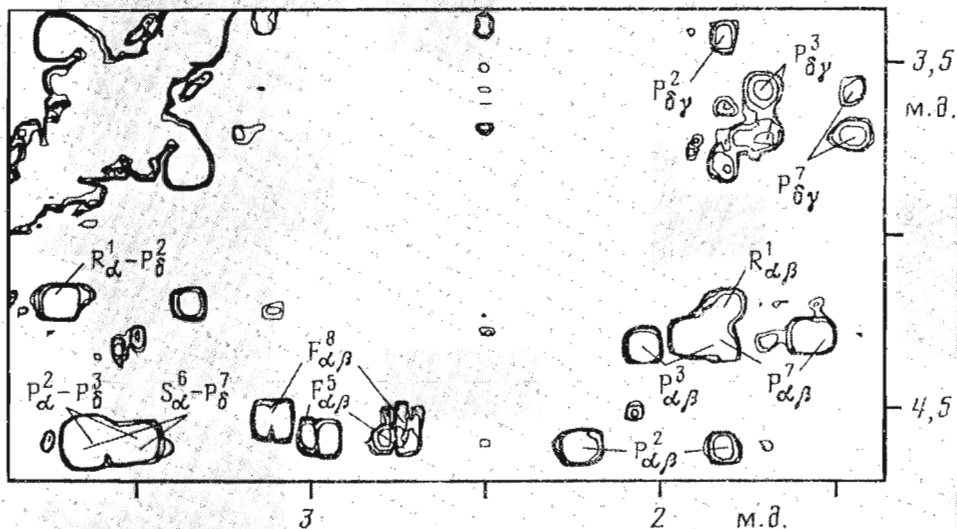
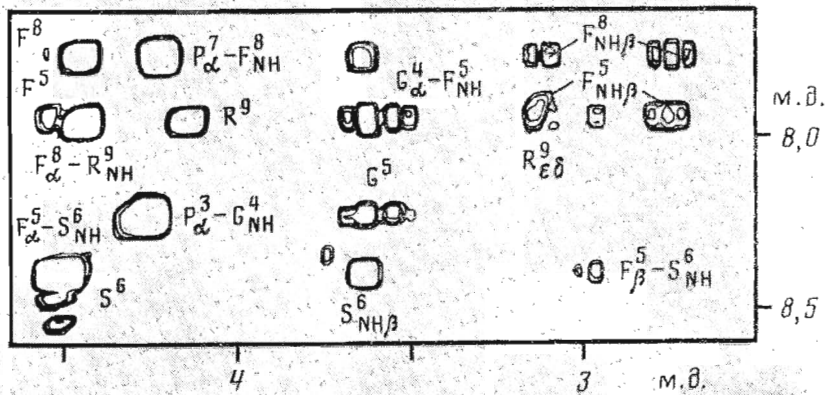


Рис. 2. NOESY-спектры брадикинина в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ в состояниях I (лиофилизован из водного раствора с pH 7,8) (а, б) и III (лиофилизован из водного раствора с pH 1,5) (в, г). Показаны спектральные области δ_1 7,4—8,7, δ_2 2,7—5,7 м. д. (а), δ_1 3,5—4,8, δ_2 1,3—3,7 м. д. (б), δ_1 7,6—8,6, δ_2 2,5—4,7 м. д. (в) и δ_1 3,3—4,7, δ_2 1,3—3,8 м. д. (г)

лотных остатков одного типа. В COSY-спектре брадикинина в DMSO легко идентифицировать связи между протонами NH и C^αH , C^αH и C^βH и т. д. и выделить сигналы соответствующих протонов (рис. 1 а, б). Отнесение спиновых систем к положению в аминокислотной последовательности получено анализом NOESY-спектров, которые позволяют идентифицировать ядерные эффекты Оверхаузера (ЯЭО) между пространственно сближенными протонами (межпротонное расстояние $< 5 \text{ \AA}$). Основы и стратегия применения метода изложены в работах [13, 15]. В NOESY-спектрах пептидов обычно возможны ЯЭО между протонами $\text{C}_i\alpha\text{H} - \text{N}_{i+1}\text{H}$ ($d_{\alpha\text{N}}$ -связь), $\text{N}_i\text{H} - \text{N}_{i+1}\text{H}$ (d_{NN} -связь), $\text{C}_i\beta\text{H} - \text{N}_{i+1}\text{H}$ ($d_{\beta\text{N}}$ -связь), а также другие ЯЭО, характерные для конкретной конформации пептидной молекулы.

В NOESY-спектрах брадикинина в DMSO наблюдали $d_{\alpha\text{N}}$ -, d_{NN} - и $d_{\beta\text{N}}$ -связи (рис. 1—3). Это позволило сделать полное отнесение сигналов протонов (табл. 1). Измерены также температурные коэффициенты

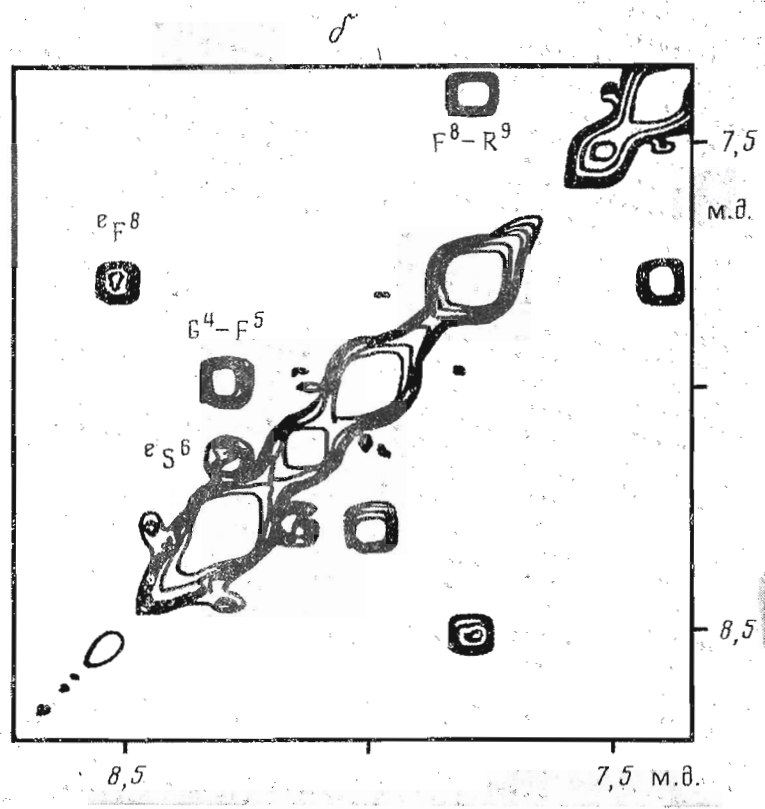
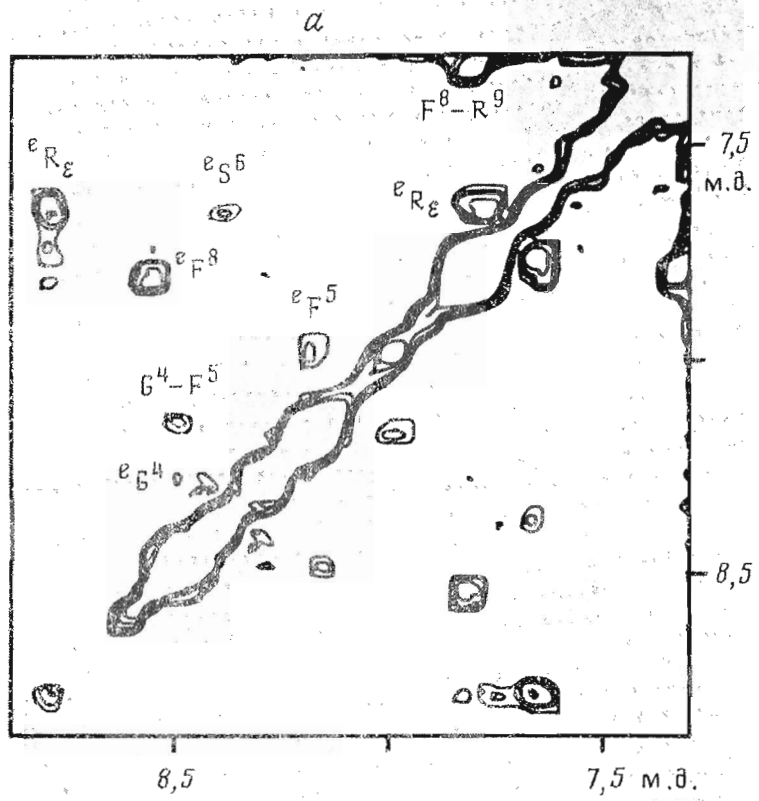


Рис. 3 а, б

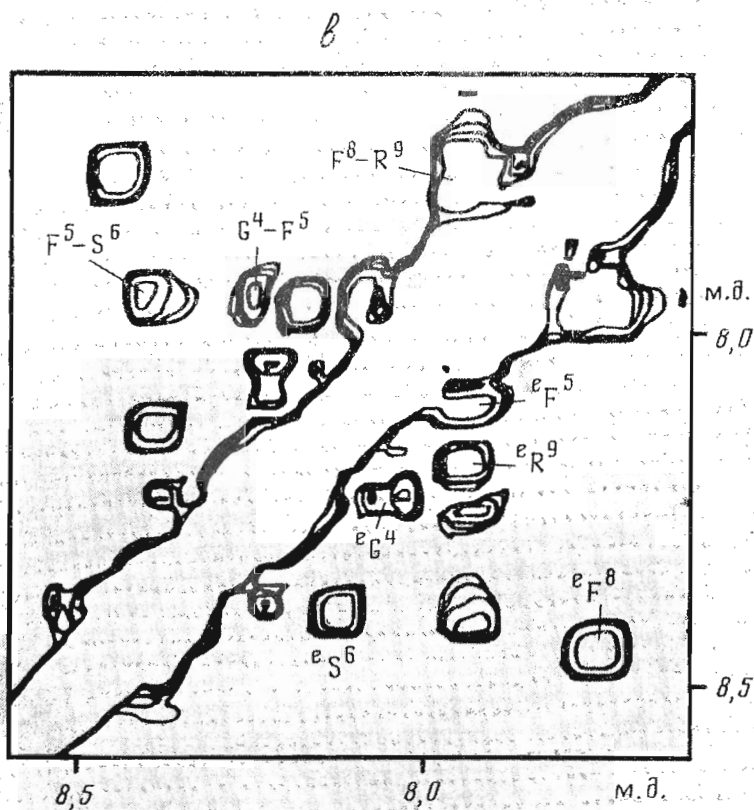


Рис. 3. Спектральные области амидных протонов NOESY-спектров брадикинина в $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ в состояниях I (δ 7,3—8,9 м. д. (а)), II (δ 7,3—8,7 м. д. (б)) и III (δ 7,6—8,6 м. д. (в)). Индексом «е» обозначены кросс-пики, вызванные обменом между изомерами с *транс*- и *цис*-конфигурацией пептидных связей X-Pro

амидных протонов $\Delta\delta_{\text{NH}}/\Delta T$ и вицинальные константы спин-спинового взаимодействия (КССВ) (табл. 1). Все указанные параметры определены для трех состояний молекулы брадикинина, полученных лиофилизацией водных растворов пептида с рН 7,7; 4,4; 1,5 (состояния I — III соответственно). Типичные значения pK для N-концевой α -аминогруппы $\sim 9-10$, а для C-концевой карбоксильной группы $\sim 2-3$. Следовательно, в водном растворе при рН 7,8 и 4,4 преобладают молекулы брадикинина с положительно заряженной N-концевой α -аминогруппой и отрицательно заряженной C-концевой карбоксильной группой, а при рН 1,5 C-концевая карбоксильная группа протонирована. В предположении, что состояния ионизированных групп мало изменяются в процессе лиофилизации и повторного растворения в DMSO, следует ожидать, что молекула брадикинина в состоянии III существенно отличается от молекул в сходных состояниях I и II.

Во всех состояниях пептидные связи X-Pro имеют *транс*-конфигурацию, хотя наблюдается небольшая примесь конформеров с *цис*-конфигурацией по крайней мере одной связи X-Pro. Из-за небольшого (менее 5%) содержания второго конформера рассматривали только конформер молекулы брадикинина с *транс*-конфигурацией всех пептидных связей. *транс*-Конфигурация связей X-Pro доказана с помощью спектров NOESY. Для *транс*-конфигурации связи X-Pro характерно пространственное сближение одного или обоих протонов C^δH остатка пролина с протоном C^αH предшествующего остатка X и, следовательно, наличие ЯЭО между $\text{C}_i^\alpha\text{H}$ и $\text{C}_{i+1}^\delta\text{H}$ остатка Pro [16] (см. рис. 1а, 2б, в).

Химические сдвиги протонов брадикинина в состоянии II приведены в табл. 1. В табл. 2 сравниваются химические сдвиги протонов основной

Химические сдвиги (δ , м. д.) протонов брадикинина при 303 К в $(CD_3)_2SO$ в состоянии IIIПептид лиофилизирован из H_2O при pH 4,4

Аминокислотный остаток	NH	$C^\alpha H$	$C^\beta H$	Другие протоны
Arg ¹	* —	3,92	1,57; 1,57	$C^\gamma H$ 1,58; 1,58; $C^\delta H_2$ 3,13; $N^\epsilon H$ 8,09
Pro ²		4,59	1,80; 2,19	$C^\gamma H$ 1,79; 1,79; $C^\delta H$ 3,34; 3,70
Pro ³		4,30	1,77; 2,05	$C^\gamma H$ 1,36; 1,36; $C^\delta H$ 3,55; 3,66
Gly ⁴	8,36	3,45; 3,75		
Phe ⁵	8,04	4,54	2,79; 3,01	
Ser ⁶	8,33	4,62	3,67; 3,67	
Pro ⁷		4,32	1,52; 2,87	$C^\gamma H$ * 1,66; 1,66; $C^\alpha H$ 3,55; 3,67
Phe ⁸	7,85	4,47	2,77; 3,66	
Arg ⁹	7,45	4,01	1,64; 1,64	$C^\gamma H$ 1,50; 1,50; $C^\alpha H$ 3,13; $N^\epsilon H$ 8,09

* Химические сдвиги сигналов протонов α -NH₂ остатка Arg¹ и OH остатка Ser⁶ не удалось измерить из-за уширения сигналов вследствие быстрого обмена с протонами H₂O.

цептидной цепи брадикинина в состояниях I и III. Видны значительные (0,20 и 0,24 м. д.) изменения химических сдвигов протонов $C^\alpha H$ остатков Arg¹ и Arg⁹ в состояниях I и III. Соответствующие различия между состояниями I и II составляют 0,04 и 0,05 м. д. Изменение химического сдвига протона $C^\alpha H$ остатка Arg⁹ в состоянии III вызвано протонизацией С-концевой карбоксильной группы, однако при этом меняется также химический сдвиг протона $C^\alpha H$ остатка Arg¹.

Эти результаты позволяют предположить, что в состояниях I и II существует взаимодействие между N-концевой положительно заряженной α -амино- и С-концевой отрицательно заряженной карбоксильной группами. При протонизации С-концевой группы такое взаимодействие разрушается, что вызывает изменение химического сдвига протона $C^\alpha H$ остатка Arg¹. Химические сдвиги остальных протонов меняются незначительно (в том числе протонов $C^\delta H_2$ и $N^\epsilon H$ гуанидиновых групп остатков Arg¹ и Arg⁹). Химические сдвиги протонов NH намного чувствительнее к изменению экспериментальных условий по сравнению с протонами $C^\alpha H$. Протонизация С-концевой карбоксильной группы вызывает сильнополюсный сдвиг сигналов протонов NH остатков Gly⁴, Phe⁵, Phe⁸ и относительно большой слабополюсный сдвиг сигнала протона NH остатка Arg⁹. Слабополюсный сдвиг сигнала протона NH остатка Arg⁹ является следствием протонизации С-концевой карбоксильной группы. Остальные сильнополюсные сдвиги сигналов протонов NH указывают на конформационные перестройки в пептиде. Наблюдается также изменение неэквивалентности химических сдвигов протонов $C^\alpha H$ остатка Gly⁴. В состояниях I, II она

Таблица 2

Изменение химических сдвигов протонов NH и $C^\alpha H$ брадикинина при переходе из состояния I в состояние III в $(CD_3)_2SO$, 303 КПептид лиофилизирован из H_2O при pH 7,8 (I) и 1,5 (III)

Аминокислотный остаток	NH	$C^\alpha H$
Arg ¹	(-0,09) *	-0,20 (-0,09) *
Pro ²		-0,02
Pro ³		-0,02
Gly ⁴	0,25	-0,06; 0,09
Phe ⁵	0,22	-0,07
Ser ⁶	0,02	-0,05
Pro ⁷		0,07
Phe ⁸	0,07	0,06
Arg ⁹	-0,60	-0,24 (-0,09) *

* В скобках указаны изменения химических сдвигов $N^\epsilon H$ (в разделе NH) и $C^\delta H_2$ (в разделе $C^\alpha H$) протонов остатков Arg¹ и Arg⁹.

Температурные коэффициенты химических сдвигов амидных протонов и КССВ протонов Н-NC^α-Н в состояниях I–III

Амино-кислотный остаток	$(\Delta\delta_{\text{NH}}/\Delta T) \cdot 10^3$, м.д./К				$^3J_{\text{NHSC}^{\alpha}\text{H}}$, Гц		
	I	II	III	I + LiClO ₄	I	II	III
Gly ⁴	2,2	3,2	2,4	2,4			
Phe ⁵	1,9	1,8	3,3	2,8	8,3	8,3	7,2
Ser ⁶	6,4	5,4	6,6	6,8	6,1	6,3	6,5
Phe ⁸	4,4	3,0	2,2	3,1	8,4	8,4	9,0
Arg ⁹	1,1	1,1	3,0	3,0	6,9	6,8	9,0

составляет 0,23 м.д., а в состоянии III — 0,08 м.д. Такое изменение свидетельствует о дестабилизации конформации молекулы. Изменение vicинальных КССВ (табл. 3) также указывает на конформационные перестройки молекулы при переходе из состояний I и II в состояние III. В состояниях I и II наблюдаются низкие значения температурных коэффициентов химических сдвигов амидных протонов остатков Phe⁵ и Arg⁹ (табл. 3). В состоянии III коэффициенты для этих протонов повышаются, а для протона NH остатка Phe⁸ коэффициент понижается. Полученные результаты можно объяснить конформационными перестройками молекулы брадикинина, вызванными разрушением рассмотренного выше взаимодействия между N- и C-концевыми группами.

Для разрушения взаимодействия между положительно заряженной гуанидиновой группой остатка Arg и отрицательно заряженной карбоксильной группой остатка Glu в тетрапептиде Boc-Arg-Ala-Gly-Glu-NHEt можно применять LiClO₄ [17]. Благодаря небольшому ионному радиусу (0,60 Å по Полингу) катионы Li⁺ взаимодействуют с отрицательно заряженной C-концевой карбоксильной группой и ослабляют взаимодействие последней с положительно заряженными группами. Увеличение значений $\Delta\delta_{\text{NH}}/\Delta T$ сигналов протонов NH остатков Phe⁵ и Arg⁹ после добавления LiClO₄ в раствор брадикинина в DMSO свидетельствует о дестабилизации конформации (табл. 3) молекулы.

В NOESY-спектре брадикинина в DMSO (см. рис. 1в, 2а, в) видны все d_{αN}-связи для всех состояний молекулы. Это объясняется относительно короткими межпротонными расстояниями d_{αN} (2,2–3,6 Å). В результате при времени обмена компонент намагниченности 0,4 с наблюдаются все d_{αN}-связи. Более информативны для конформационного анализа d_{NN}-связи (соответствующие им межпротонные расстояния изменяются в пределах 2,0–4,7 Å). В NOESY-спектрах брадикинина в состояниях I и II видны две d_{NN}-связи (Gly⁴(NH...HN)Phe⁵, Phe⁸(NH...HN)Arg⁹) из трех возможных (рис. 3). Эти данные, а также сопоставлявшиеся выше значения химических сдвигов, КССВ и температурных коэффициентов химических сдвигов сигналов протонов NH доказывают идентичность состояний I и II молекулы брадикинина. Для состояния III появляется дополнительная d_{NN}-связь (Phe⁵(NH...HN)Ser⁶) (рис. 3в) в средней части молекулы. Это также можно объяснить дестабилизацией молекулы или разрушением ее конформации при протонизации C-концевой карбоксильной группы в состоянии III. Расстояние между протонами NH Phe⁵(NH...HN)Ser⁶ тогда менее фиксировано, этим объясняется появление соответствующей d_{NN}-связи. В состоянии III дополнительно появляется d_{βN}-связь Phe⁵(C^βH...HN)Ser⁶, что указывает на переориентацию боковой цепи остатка Phe⁵. Таким образом, в состоянии I d_{NN}-связи характеризуют стабилизированную конформацию молекулы брадикинина.

Полностью аналогичная картина наблюдалась нами ранее для циклического аналога брадикинина, в молекуле которого сигналы протонов NH остатков Phe⁵ и Arg⁹ имели низкие величины температурных коэффициентов химических сдвигов протонов NH, близкие к брадикинину в состоянии II значения КССВ, а также сходную картину ЯЭО в 2D-NOESY-спектрах [18]. Кроме того, спектры КД брадикинина и его циклического

аналога мало различаются [19], что свидетельствует об однотишной конформации этих молекул. Учитывая все эти факты, для брадикинина в состоянии I мы предполагаем, как и в *цикло*-аналоге, наличие β -изгибов в последовательностях Pro²-Pro³-Gly⁴-Phe⁵ и Ser⁶-Pro⁷-Phe⁸-Arg⁹.

Протонизация карбоксильной группы разрушает эту конформацию. На это указывает появление в NOESY-спектре дополнительных ЯЭО между протонами NH(Phe⁵) и NH(Ser⁶), C ^{β} H(Phe⁵) и NH(Ser⁶), а также изменение остальных рассмотренных выше параметров. Для молекулы, имеющей одну конформацию, мало вероятно появление всех ЯЭО в NOESY-спектре. Следовательно, конформация молекулы брадикинина в состоянии III характеризуется равновесием многих конформеров. В растворах воды взаимодействие разноименно заряженных групп в N- и C-концах пептида сильно ослаблено и молекула брадикинина имеет более или менее разупорядоченную структуру, как это предполагалось ранее [11].

Экспериментальная часть

Чистота брадикинина контролировалась ТСХ. Спектры ¹H-ЯМР 18 мМ растворов пептида в (CD₃)₂SO получены на спектрометре Bruker WM-360 с рабочей частотой 360 МГц, оснащенном ЭВМ Asprect 2000, в 5-мм ампуле в интервале температур 293—333 К. Для измерения pH водных растворов брадикинина использовали комбинированный электрод МТ 442 и электрометр ЭЦ-2. COSY-спектры получены с помощью последовательности, состоящей из двух неселективных 90-градусных импульсов [14]:

$$\text{[} (90^\circ - t_1 - 90^\circ - t_2)_n \text{]}$$

где t_1 и t_2 — периоды эволюции и наблюдения сигналов. Время t_1 изменялось в интервале 0,125—64 мс с шагом 0,125 мс, что соответствует ширине спектра в направлении ω_1 4000 Гц, $n = 64$.

NOESY-спектры получали, используя трехимпульсную последовательность [13, 15]:

$$\text{[} (90^\circ - t_1 - 90^\circ - \tau_m - 90^\circ - t_2)_n \text{]}$$

при времени смешивания компонент намагниченности $\tau_m = 0,4$ с и $n = 112$. Время $\tau_m = 0,4$ с менялось в ходе эксперимента случайным образом в пределах 10%. Выбор времени t_1 — такой же, как в эксперименте COSY. Матрица данных COSY- и NOESY-спектров, содержащая 512×2048 точек, дополнялась нулями до 2048×2048 точек, что соответствует разрешению 3,9 Гц на точку. Перед преобразованием Фурье матрицу данных умножали в направлениях t_1 и t_2 на функции, уменьшающие полуширину сигналов в спектре:

$$\begin{aligned} & \sin \left[\frac{t_1(\pi - \varphi)}{t_{S1}} + \varphi \right] \text{ для } t_1\text{-направления,} \\ & \sin^2 \left[\frac{t_2(\pi - \varphi)}{t_{S2}} + \varphi \right] \text{ для } t_2\text{-направления,} \end{aligned}$$

где t_{S1} и t_{S2} выбраны так, чтобы функции принимали нулевые значения для последних экспериментальных точек в t_1 - и t_2 -направлениях. Фазовые сдвиги φ в направлениях t_1 и t_2 составляли $\pi/32$ и $\pi/8$. Проводилась симметризация COSY- и NOESY-спектров [20]. Химические сдвиги сигналов в спектрах ¹H-ЯМР измерены относительно внутреннего стандарта тетраметилсилана с точностью $\pm 0,01$ м.д. Точность измерения КССВ $\pm 0,2$ Гц. Интервал температур для определения температурных коэффициентов 293—333 К, ошибка определения 10%.

Авторы выражают благодарность д-ру хим. наук М. И. Титову и канд. хим. наук Ж. Д. Беспаловой за предоставление образца брадикинина.

1. Regoli D., Varabe J. *Pharmacol. Rev.*, 1980, v. 32, № 1, p. 1—46.
2. Иванов В. Т., Филатова М. П., Рейссманн З., Реутова Т. О., Челяева Н. М. *Биоорг. химия*, 1977, т. 3, № 9, с. 1157—1168.
3. Ефремов Е. С., Филатова М. П., Реутова Т. О., Степанова Л. Н., Рейссманн З., Иванов В. Т. *Биоорг. химия*, 1977, т. 3, № 9, с. 1169—1179.
4. Филатова М. П., Рейссманн З., Реутова Т. О., Иванов В. Т., Григорян Г. Л., Шапиро А. М., Розанцев Э. Г., *Биоорг. химия*, 1977, т. 3, № 9, с. 1181—1189.
5. Ivanov V. T., Filatova M. P., Reissmann Z., Reutova T. O., Efremov E. S., Pashkov V. S., Galaktionov S. G., Grigoryan G. L., Ovchinnikov Yu. A. In: *Peptides: chemistry, structure, biology*/Eds Walter R., Meinhofer J. N. Y.: Ann. Arbor, 1975, p. 151—157.
6. Cann J. K., Stewart J. M., London R. E., Matwiyoff N. A. *Biochemistry*, 1976, v. 15, № 1, p. 498—504.
7. Lintner K., Fermandjian S. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1979, v. 91, № 4, p. 803—811.
8. Раيفا А. С. М., Juliano L. In: *Peptides. Proceedings 5-th American Peptide Symposium*. N. Y., 1977, p. 337—339.
9. Чикифорович Г. В., Галактионов С. Г., Чипенс Г. И. Конформации пептидных биорегуляторов. М.: Медицина, 1983, с. 70—84.
10. London R. E., Stewart J. M., Cann J. R., Matwiyoff N. A. *Biochemistry*, 1978, v. 17, № 16, p. 2270—2277.
11. Denys L., Bothner-Bu A. A., Fisher G. H., Ryan J. W. *Biochemistry*, 1982, v. 21, № 25, p. 6531—6536.
12. Aue W. P., Bartholdi E., Ernst R. R. *J. Chem. Phys.*, 1976, v. 64, № 5, p. 2229—2246.
13. Jeener J., Meier B. H., Bachmann P., Ernst R. R. *J. Chem. Phys.*, 1979, v. 71, № 11, p. 4546—4553.
14. Vax A., Freeman R. J. *Magn. Res.*, 1981, v. 44, № 3, p. 542—545.
15. Kurmar A., Ernst R. R., Wüthrich K. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1980, v. 95, № 1, p. 1—6.
16. Арсеньев А. С., Кондаков В. И., Майоров В. Н., Волкова Т. М., Гримин Е. В., Быстров В. Ф., Овчинников Ю. А. *Биоорг. химия*, 1983, т. 9, № 6, с. 768—793.
17. Mayer R., Lancelot G. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1981, v. 103, № 16, p. 4738—4742.
18. Саулитис Ю. Б., Лиениньш Э. Э., Секацис И. П., Шендерович М. Д., Мутулис Ф. К., Мутуле И. Э., Чипенс Г. И. *Биоорг. химия*, 1985, т. 11, № 8, с. 1013—1025.
19. Chipens G., Mutulis F., Katayev B., Klusha V., Misina I., Myshlyiakova N. *Int. J. Peptide and Protein Res.*, 1981, v. 18, № 2, p. 302—311.
20. Wider G., Macura S., Anil Kumar, Ernst R. R., Wüthrich K. *J. Magn. Reson.*, 1984, v. 56, № 2, p. 207—234.

Поступила в редакцию
24.VI.1985
После доработки
30.VIII.1985

TWO-DIMENSIONAL $^1\text{H-NMR}$ SPECTROSCOPY STUDY OF THE BRADYKININ CONFORMATIONAL STATE IN DIMETHYL SULFOXIDE SOLUTION

SAULITIS J. B., LIEPINSH E. E., SEKACIS I. P., MUTULIS F. K.,
MUTULE I. E., CHIPENS G. I.

*Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences of the
Latvian SSR, Riga*

The role of charged groups of the nonapeptide bradykinin in stabilization of its spatial structure in dimethyl sulfoxide solution was investigated. The signal assignment in the $^1\text{H-NMR}$ spectra was achieved by means of two dimensional correlated spectroscopy (COSY) and nuclear Overhauser enhancement spectroscopy (NOESY). The changes in the NH and C^αH proton chemical shifts of the Arg¹ and Arg⁹ residues, variations both in temperature coefficients of chemical shifts of NH-resonances and coupling constants, as well as the appearance of additional NOE cross-peaks in NOESY spectra for $d_{\alpha\text{N}}$ and $d_{\beta\text{N}}$ $^1\text{H-}^1\text{H}$ distances were revealed by comparing the NMR spectra for two states — with the protonated C-terminal carboxyl group and deprotonated one.

The experimental results are in agreement with the assumption that the conformation of the peptide in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ is stabilized by electrostatic interaction between the oppositely charged N- and C-terminal groups. The conformation with deprotonated α -carboxyl group is characterized by two β -turns in the sequences Pro²-Pro-Gly-Phe³ and Ser⁶-Pro-Phe-Arg⁹.