



УДК 543.422.25:547.964.4

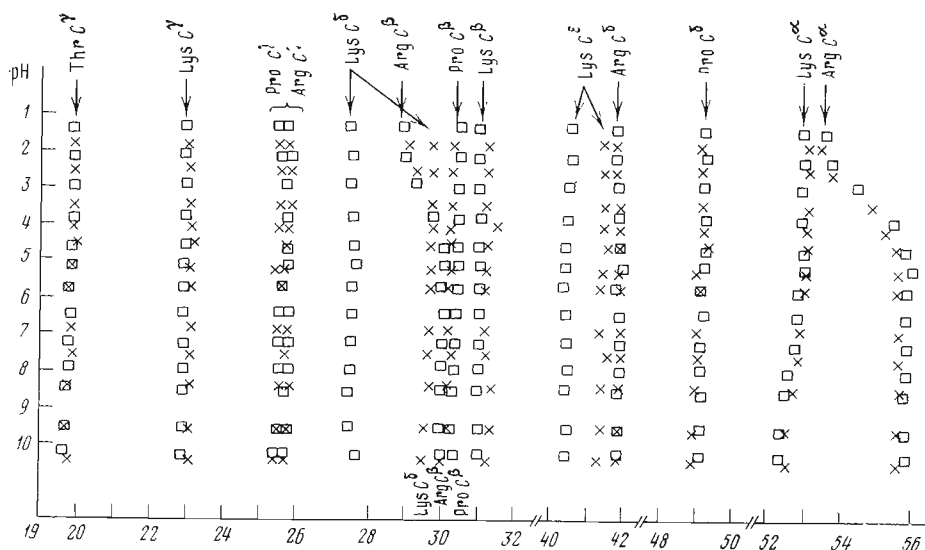
ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ТАФЦИНА  
МЕТОДОМ  $^1\text{H}$ - И  $^{13}\text{C}$ -ЯМР*Секацис И. П., Лиепиньш Э. Э., Веретенникова Н. И.,  
Чинис Г. И.**Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига*

Методом  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР изучена конформация Thr-Lys-Pro-Arg (I) и Thr-Lys(Z)-Pro-Arg (II) в растворах  $^2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{C}^2\text{H}_3\text{O}^2\text{H}$ , ДМСО- $d_6$ . Изменение химических сдвигов  $^{13}\text{C}$  при титровании, а также значения времен спин-решеточной релаксации  $T_1$  указывают на отсутствие конформации, стабилизированной солевыми мостиками в  $^2\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{C}^2\text{H}_3\text{O}^2\text{H}$ . Низкое значение температурного коэффициента NH аргинина и величины КССВ пептида  $\text{HNC}^{\alpha}\text{H}$  в растворе ДМСО позволяют предположить структуру  $\beta$ -изгиба для пептида (I), но не для (II).

Тафцин, фрагмент тяжелой цепи иммуноглобулинов IgG с аминокислотной последовательностью Thr-Lys-Pro-Arg, обладает широким спектром биологического действия [1]. Особое внимание вызывает его способность стимулировать миграцию и фагоцитоз полиморфно-ядерных лейкоцитов [2], а также индуцировать иммуногенез макрофагов [3]. Тафцин, имеющий относительно простую структуру и небольшую величину молекулы, чрезвычайно удобен для изучения его пространственной структуры и установления взаимосвязи между ней и биологической активностью аналогов тафцина [4–7].

Детальные исследования конформации этого пептида до сих пор не публиковались, однако в некоторых работах высказывались предположения о реализации в тафцине свернутых конформаций [4, 5]. Так, Конопинска Д. и др. [4] на основе предварительных измерений спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР предположили, что молекула тафцина имеет  $\beta$ -изгиб типа 4 $\rightarrow$ 1, дополнительно стабилизированный ионной связью между пространственно сближенными концевыми N-амино- и карбоксильной группами. Исследование спектров КД тафцина и его метилового эфира позволило Вичару и др. [5] высказать предположение о квазициклической конформации тафцина, стабилизированной ионным взаимодействием между  $\epsilon$ -аминогруппой лизина и анионной формой карбоксильной группы аргинина. Последняя конформация тафцина подтверждена также теоретическим конформационным анализом [6]. Фитцватер, Ходес и Шерага [7] на основании конформационных расчетов предложили общую структуру конформеров тафцина, которую можно описать как «вшильку с двумя расщепленными концами», где каждый из этих концов состоит из amino- или карбоксигруппы пептидной цепи и боковых радикалов лизина или аргинина.

С целью установления конформации тафцина в настоящей работе проведено исследование пространственной структуры биологически активного липейного тетрапептида, тафцина Thr-Lys-Pro-Arg (I) и его аналога Thr-Lys(Z)-Pro-Arg (II) методом спектроскопии ЯМР на ядрах  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ .



Изменение химических сдвигов  $^{13}\text{C}$  в зависимости от pH для соединений (I) (обо-

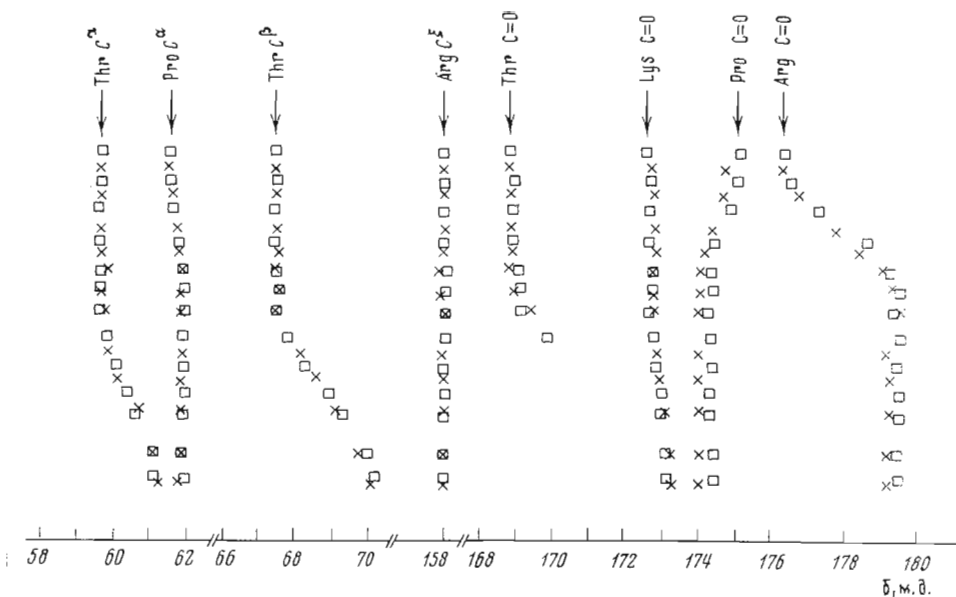
На рисунке показаны кривые титрования соединений (I) и (II). Титрование проводилось для выявления влияния катиона на величину  $pK_a$   $\alpha$ -карбоксовой группы, установления pH-зависимости соотношения *цис*-, *транс*-изомеров относительно пептидной связи Lys-Pro, а также для устранения неопределенностей в интерпретации сигналов поглощения в спектрах (I) и (II).

Химические сдвиги (табл. 1)  $\beta$ - и  $\delta$ -углеродов пролина показывают, что пептидная связь Lys-Pro имеет преимущественно *транс*-конфигурацию. Наличие в некоторых спектрах сигналов низкой интенсивности на уровне шумов может указать на существование небольшой доли *цис*-изомера по связи Lys-Pro. В обоих соединениях не наблюдалось изменения доли последнего в зависимости от pH. Приближенная оценка интенсивностей соответствующих сигналов позволяет заключить, что содержание *цис*-изомера  $\leq 10\%$ . Разница в химических сдвигах  $^{13}\text{C}$   $\beta$ - и  $\gamma$ -углеродов может быть использована для определения угла  $\psi$  в пролине [8]. Применение этой методики для соединений (I) и (II) привело к значению  $\psi - 50^\circ$ , что согласуется с известными данными [4, 6].

Результаты титрования показывают, что в соединениях (I) и (II) нет различий в значениях  $pK_a$  для  $\alpha$ -амино- и карбоксовой группы в пределах ошибки эксперимента:  $3,2 \pm 0,2$  и  $7,9 \pm 0,2$  соответственно. Полученные результаты можно интерпретировать как отсутствие какой-либо ионной связи между аммониевым катионом  $\epsilon$ -аминогруппы лизина и анионом карбоксовой группы аргинина пептида (I) в водных растворах.

При титровании наблюдалось некоторое уширение сигналов от  $\text{C}^\alpha$  и  $\text{C}=\text{O}$  углеродов в области pH, близкой к значениям  $pK$ . Сигнал  $\text{C}=\text{O}$  треонина при pH 8 уширился настолько, что перестал наблюдаться в спектре.

Весьма ценную информацию о динамике конформационных переходов в пептидах можно получить из значений времени спин-решеточной релаксации  $T_1$  для ядер  $^{13}\text{C}$ . В табл. 1 приведены значения  $NT_1$  для протонированных углеродов ( $N$  — число атомов водорода, связанных с углеродом). При выполнении условия предельного сужения:  $(\omega_H + \omega_C) \cdot \tau_{\text{эфф}} \ll 1$ , где  $\omega_H$  и  $\omega_C$  — угловые частоты резонанса протонов и углеродов,  $\tau_{\text{эфф}}$  — эффективное время корреляции молекулы, большее значение  $NT_1$  соответствует более мобильному углероду в пептидной цепи. Это условие применимо к



значен квадратиком) и (II) (обозначен крестом)

пептидным гормонам при частоте спектрометра 22,63 МГц для <sup>13</sup>C [9–11]. Сравнение абсолютных величин  $NT_1$  с литературными данными затруднено в связи с различными экспериментальными условиями в отдельных работах, при которых определены  $NT_1$  для других олигопептидов: температуры, концентрации, вязкости, молекулярного веса, напряженности магнитного поля.

Если в тафцине существует солевой мостик между ε-аминогруппой лизина и карбоксилем аргинина, тогда должны наблюдаться ограничения в движении боковой цепи лизина и можно ожидать, что  $NT_1$  для C<sup>ε</sup> лизина будет сравнимо с  $NT_1$  для C<sup>α</sup> аргинина при pH 5,7. Ясно, что в данном случае это условие не выполняется:  $NT_{1i}=1874$  мс для C<sup>ε</sup> лизина и 345 мкс для C<sup>α</sup> аргинина при pH 5,71 и 2068 мс и 448 мс при pH 1,30 соответственно. Результаты измерения времени спин-решеточной релаксации четко указывают, что боковая цепь лизина не испытывает существенного ограничения во внутримолекулярном движении. Значения  $NT_1$  C<sup>α</sup> углеродов в пептидах (I) и (II) увеличиваются от середины пептида к концам, как и следовало ожидать для подвижных пептидных гормонов [10, 11]. Однако несколько завышенное значение  $NT_1$  для C<sup>α</sup> треонина может свидетельствовать об отсутствии солевого мостика также между N- и C-концами и о большей подвижности N-конца пептидов (I) и (II) по сравнению с фрагментом Lys-Pro-Arg в водных средах.

Время релаксации  $T_1$  существенно не различаются и в растворе C<sup>2</sup>H<sub>5</sub>O<sup>2</sup>N—H<sub>2</sub>O (3 : 1). Для отдельных углеродов соблюдаются те же соотношения, что и в водных растворах. Уменьшение средних значений  $NT_1$  для всех углеродов может быть вызвано сменой растворителя.

Спектры <sup>13</sup>C-ЯМР в растворе метанол—вода регистрировались после добавления трилона В, снимающего значительное уширение сигналов C<sup>α</sup> и C=O остатков аргинина и треонина. Наличие такого уширения для треонина может указывать на пространственную близость N- и C-концов тафцина.

Нами определены также температурные коэффициенты, КССВ HC<sup>α</sup>—NH и химические сдвиги амидного протона аргинина для пептидов (I) и (II) в разных растворителях из спектров <sup>1</sup>H-ЯМР (табл. 2). Наиболее интересно поведение сигнала этого протона в растворе DMSO-d<sub>6</sub> для тафцина (I). Малый температурный коэффициент, заметно меньшее зна-

Таблица 1

Химические сдвиги  $^{13}\text{C}$ ,  $\delta$  (м.д.) и  $NT_1$  (мс) для соединений (I), (II)

		(I)						(II)					
		$^2\text{H}_2\text{O}$ , pH 5,71		$^2\text{H}_2\text{O}$ , pH 1,30		$\text{C}^2\text{H}_3\text{O}^2\text{H}/\text{H}_2\text{O}$		ДМСО- $d_6$		$^2\text{H}_2\text{O}$ , pH 5,71		$^2\text{H}_2\text{O}$ , pH 1,80	
		$\delta$	$NT_1$	$\delta$	$NT_1$	$\delta$	$NT_1$	$\delta$		$\delta$	$NT_1$	$\delta$	$NT_1$
Thr	$\text{C}^\alpha$	59,48	469	59,50	625	59,74	219	61,19		59,61	287	59,49	368
	$\text{C}^\beta$	67,35	659	67,26	706	67,61	—	68,70		67,61	215	67,26	545
	$\text{C}^\gamma$	19,71	2118	19,84	2400	19,71	1316	20,97		19,71	1776	19,79	1915
	$\text{C}=\text{O}$	169,12	—	168,80	—	169,58	—	174,38		169,60	—	168,71	—
Lys	$\text{C}^\alpha$	52,73	300	52,81	414	52,53	162	51,17		52,85	202	52,93	228
	$\text{C}^\beta$	30,95	504	30,84	496	31,08	291	32,40		31,08	280	31,10	368
	$\text{C}^\gamma$	22,75	692	22,77	790	22,90	448	22,91		23,02	420	22,90	612
	$\text{C}^\delta$	27,38	1100	27,35	1396	27,51	581	28,35		29,40	570	29,54	511
	$\text{C}^\epsilon$	40,18	1874	40,34	2068	40,24	840	**		41,22	526	41,24	706
	$\text{C}=\text{O}$	172,63	—	172,51	—	172,31	—	171,57		172,76	—	172,64	—
Pro	$\text{C}^\alpha$	61,76	260	61,39	368	61,76	161	61,31		61,69	218	61,39	213
	$\text{C}^\beta$	30,24	530	30,28	780	30,24	225	30,76		30,11	434	30,15	591
	$\text{C}^\gamma$	25,49	628	25,45 *	844	25,56	405	25,54		25,56	602	25,57 *	689
	$\text{C}^\delta$	49,02	308	49,05	474	48,89	—	48,11		48,96	232	49,01	357
	$\text{C}=\text{O}$	174,19	—	175,06	—	173,61	—	172,00		173,93	—	174,71	—
Arg	$\text{C}^\alpha$	55,72	345	53,37	448	55,39	184	54,80		55,40	214	53,23	327
	$\text{C}^\beta$	29,85	496	28,68	538	30,11	225	29,99		30,11	434	28,90	577
	$\text{C}^\gamma$	25,49	628	25,62 *	844	25,56	405	26,19		25,56	602	25,40 *	689
	$\text{C}^\delta$	41,74	746	41,59	1166	41,87	425	**		41,81	794	41,58	839
	$\text{C}^\epsilon$	158,01	—	157,89	—	158,20	—	158,97		157,90	—	157,92	—
	$\text{C}=\text{O}$	179,26	—	176,18	—	178,48	—	176,10		179,41	—	176,14	—

\* Отнесение может быть обратным.

\*\* Сигнал перекрывается растворителем.

Таблица 2

Химические сдвиги при 25° С,  $\delta$  (м.д.), температурные коэффициенты  $k \cdot 10^3$  (м.д./град) и КССВ  $^3J_{\text{H}-\text{NC}^\alpha\text{H}}$  (Гц) NH-протона Arg соединений (I)–(III)

Растворитель	(I)			(II)			(III)		
	$\delta$	$k$	$^3J$	$\delta$	$k$	$^3J$	$\delta$	$k$	$^3J$
ДМСО- $d_6$	7,26	2,1	5,9	8,13	5,9	6,5	7,29	2,5	5,8
$\text{H}_2\text{O}$ (pH 5,71)	7,95	10,0	7,0	7,87	9,0	7,3	—	—	—
ДМСО- $d_6$ – $\text{H}_2\text{O}$ , 3 : 1	7,47	4,2	7,0	—	—	—	—	—	—
$\text{C}^2\text{H}_3\text{O}^2\text{H}$ – $\text{H}_2\text{O}$ , 3 : 1	7,62	5,6	7,6	—	—	—	—	—	—

чение КССВ, большой сдвиг NH в сильные поля по сравнению с аналогом (II) могут указывать на то, что этот протон участвует во внутримолекулярной водородной связи (ВВС). ВВС типа 4→1 часто наблюдается в малых линейных и циклических пептидах, содержащих остаток пролина [12, 13]. В случае тафцина  $\beta$ -изгиб индуцируется растворителем, так как при смене растворителей или добавлении  $\text{H}_2\text{O}$  к ДМСО температурный коэффициент увеличивается, что указывает на взаимодействие тафцина (I) с растворителем и повышение доли развернутых конформаций.

Спектры  $^{13}\text{C}$ -ЯМР тафцина (I) в ДМСО дают сильно уширенные сигналы всех углеродов. Поэтому точное измерение времен спин-решеточной релаксации  $T_1$  не проведено. Химические сдвиги  $^{13}\text{C}$  для тафцина сильно

меняются при переходе от  $\text{H}_2\text{O}$  к ДМСО. При этом резонансный сигнал группы  $\text{C}=\text{O}$  треонина сдвигается в слабое поле на 5,26 м.д. Так как пептиды (I) и (II) синтезированы в виде ацетатов, то, очевидно, в ДМСО происходит депротонизация  $\alpha$ -аминогруппы треонина, что вызывает сдвиги сигналов Thg в слабое поле. Таким образом, катионная форма  $\alpha$ -аминогруппы треонина не участвует в стабилизации конформации (I) в ДМСО, так как последний является деионизованным. На это указывает то, что в соединении Boc-Thr-Lys-Pro-Arg (III) резонансный сигнал NH аргинина, как и в пептиде (I), имеет малый температурный коэффициент и диамагнитный сдвиг, обусловленный наличием ВВС.

С другой стороны, замещение  $\epsilon$ -аминогруппы в соединении (II) разрушает ВВС в тафцине. Вероятно, свободная  $\epsilon$ -аминогруппа каким-то образом может участвовать в стабилизации структуры тафцина в растворе ДМСО.

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что в полярных растворителях (вода, метанол — вода) свернутая конформация тафцина, стабилизированная соевым мостиком, между N- и C-концами или  $\epsilon$ -аминогруппой лизина и C-концом, не реализуется. В этих условиях не обнаружено также каких-либо ВВС. Напротив, в растворах ДМСО тафцин имеет экранированный от растворителя амидный протон аргинина, который может участвовать в ВВС, образуя  $\beta$ -изгиб. Однако для более полного представления о конформации тафцина необходимы дополнительные исследования его N-ацилированных производных.

### Экспериментальная часть

Тафцин и его производные получены методами классической пептидной химии. Наращивание цепи проводили с помощью активированных эфиров с C-конца по методике, описанной в [14]. Физико-химические константы тафцина совпадают с литературными данными.

Спектры  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР измерены на спектрометре WH-90/DS фирмы Bruker-Physik при рабочих частотах 90 и 22, 63 МГц соответственно. Концентрация растворов 0,3 М для  $^{13}\text{C}$  и 0,05 для  $^1\text{H}$ . Спектры  $^{13}\text{C}$  сняты при  $50^\circ\text{C}$ , среднее число накоплений 2000. Химические сдвиги измерены относительно диоксана как внутреннего стандарта и пересчитаны относительно ТМС по соотношению  $\delta_{\text{ТМС}} = \delta_{\text{диоксан}} + 67,61$  м.д. Точность измерения  $\pm 0,1$  м.д. для  $^{13}\text{C}$  и  $\pm 0,01$  для  $^1\text{H}$ .

Времена спин-решеточной релаксации  $T_1$  определены при использовании импульсной последовательности типа  $(180^\circ - \tau - 90^\circ - T_\infty)$ , где  $T_\infty = 4,0$  с.  $T_1$  рассчитаны из уравнения  $\ln(A_\infty - A_\tau) = \ln 2A_\infty - \tau T_1$  [15], где  $A_\tau$  — начальная амплитуда индуцированного сигнала после 90-градусного импульса, приложенного в момент  $\tau$ , а  $A_\infty$  — предельное значение при  $\tau$  4 с. Точность определения  $T_1 \pm 10\%$ .

Титрование проведено добавлением 5 М  $^2\text{HCl}$  и 5 М  $\text{NaO}^2\text{H}$ . pH раствора определяли с помощью комбинированного стеклянного электрода на pH-метре типа OP-208 (Radelkis, Венгрия). Приведенные в работе значения pH соответствуют показаниям pH-метра в  $^2\text{H}_2\text{O}$ .

Спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР в  $\text{H}_2\text{O}$  измерены с помощью импульсного подавления сигнала воды. Генератор подавляющей частоты включали на 2 с до начала возбуждающего импульса, и накопление сигнала происходило при отсутствии облучающего поля. Температурные коэффициенты определены в диапазоне от 20 до  $60^\circ\text{C}$ .

### ЛИТЕРАТУРА

1. Najjar V. A. (1978) *Exptl Cell Biol.*, 46, 114–126.
2. Nishioka K., Constantopoulos A., Satoh P. S., Mitchell W. M., Najjar V. A. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, 310, 217–229.
3. Tzevalou E., Segal S., Stabinsky Y., Fradkin M., Spierer Z., Feldman M. (1978) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 7, 3400–3404.

4. Konopinska D., Nawrocka E., Siemion I. Z., Szymaniec St., Slopek S. (1976) in: *Peptides 1976* (Loffer A., ed.), pp. 535-539, Bruxelles.
5. Vicar J., Gut V., Fric I., Blaha K. (1976) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **41**, 3467-3473.
6. Никифорович Г. В. (1978) *Биоорганич. химия*, **4**, 1427-1430.
7. Fitzwater S., Hodes Z. I., Scheraga H. A. (1978) *Macromol.*, **11**, 805-811.
8. Siemion I. Z., Wieland Th., Pook K. H. (1975) *Angew. Chem.*, **87**, 712-714.
9. Allerhand A., Komoroski R. A. (1973) *J. Amer. Chem. Soc.*, **95**, 8228-8231.
10. Deslauriers R., Somorjai R. L. (1976) *J. Amer. Chem. Soc.*, **98**, 1931-1939.
11. Deslauriers R., Komoroski R. A., Levy G. C., Paiva A. C. M., Smith I. C. P. (1976) *FEBS Lett.*, **62**, 50-56.
12. Kopple K. D., Go A., Pilipauskas D. R. (1975) *J. Amer. Chem. Soc.*, **97**, 6830-6838.
13. Kopple K. D., Go A. (1976) *Biopolymers*, **15**, 1701-1715.
14. Veretennikova N. I., Indulen Ju. I., Nikiforovich G. V., Papsuevich O. S., Chipens G. I. (1978) in: *Symposium Papers of 11th International Symposium on Chemistry of Natural Products* (Marekov N. et al., eds), vol. 1, pp. 263-266, Golden Sands, Bulgaria.
15. Фаррар Т., Беккер Э. (1973) в кн.: *Импульсная и фурье-спектроскопия ЯМР*, с. 45, «Мир», М.

Поступила в редакцию  
25.IV.1979

### $^1\text{H}$ AND $^{13}\text{C}$ NMR STUDIES OF TUFTSIN CONFORMATION

SEKACIS I. P., LIEPINŠ E. E., VERETENNIKOVA N. I., CHIPENS G. I.

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

The method of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR has been applied to study the Thr-Lys-Pro-Arg (I) and Thr-Lys(Z)-Pro-Arg (II) conformations in  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$  and  $\text{DMSO-d}_6$ . The changes in the  $^{13}\text{C}$  chemical shifts upon titration and the spin-lattice relaxation times  $T_1$  values are indicative of the absence of a salt bridge stabilized conformation in  $\text{D}_2\text{O}$  and  $\text{CD}_3\text{OD}$ . The low values of temperature coefficient for the Arg NH resonance and coupling constant  $\text{NH-C}^\alpha\text{H}$  in  $\text{DMSO}$  are suggestive of a  $\beta$ -turn structure for (I), but not for to (II).