



УДК 547.962:543.422.23

МУЛЬТИРЕЗОНАНСНЫЙ МЕТОД ПОЛНОГО ОТНЕСЕНИЯ СИГНАЛОВ
В СПЕКТРАХ ^1H - И ^{13}C -ЯМР ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ

*Быстров В. Ф., Оханов В. В., Арсеньев А. С.,
Афанасьев В. А., Гуревич А. З.*

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

Мультиплетные протонные сигналы от аминокислотных остатков классифицированы по типам с помощью последовательного протонного мультирезонанса. Их отнесение к определенному положению в первичной структуре полипептида достигается с помощью гетероядерного селективного ЯМР $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ при наблюдении карбонильных сигналов в спектре ^{13}C -ЯМР в режиме подавления специально выбранных протонных сигналов.

В настоящее время общепризнано, что особенности пространственного строения являются доминирующими в процессе функционирования пептидно-белковых молекул. В связи с этим при изучении пептидов и белков внимание уделяется пространственной структуре в растворе и ее роли в проявлении биологической функции молекулы. Для определения строения биомолекул используется широкий набор физико-химических методов, среди которых рентгеноструктурный анализ является пока непревзойденным по точности и полноте информации. Однако в последние годы все большее применение находят спектроскопические методы, позволяющие изучать динамические особенности конформационного строения пептидов и белков в растворах. Обнадеживающие результаты получены при комплексном использовании различных спектроскопических методов [1], среди которых наиболее результативна спектроскопия ЯМР. В настоящее время реализация весьма широких возможностей спектроскопии ЯМР ограничивается рядом методических проблем. Одна из основных проблем при установлении пространственной структуры пептидов и белков в растворе методом ЯМР — отнесение сигналов спектра к индивидуальным аминокислотным остаткам [2, 3]. Для решения этой задачи разработан ряд приемов, однако большинство из них требует привлечения дополнительных, зачастую априорных, данных о пространственной структуре молекулы или синтеза селективно изотопно меченных веществ.

В настоящей работе предложен метод отнесения сигналов в спектрах ^1H и ^{13}C -ЯМР пептидов и белков с помощью мультирезонансной спектроскопии. Достоинством этого метода является то, что для отнесения сигналов нет необходимости привлекать дополнительную информацию, кроме первичной структуры молекулы.

Метод отнесения сигналов основан на различии структуры боковых цепей аминокислотных остатков. В спектрах ^1H -ЯМР пептидов проявляются только вициальные и геминальные константы спин-спинового

взаимодействия (КССВ) протонов (см. обзор [4]). Более дальние КССВ обычно < 1 Гц и, как правило, не наблюдаются в спектрах. В частности, для *транс*-пептидных связей дальняя КССВ $^1J_{NH}$ протонов $HC^{\alpha}-C'-NH$, согласно расчету [5], $< 0,5$ Гц. Это обстоятельство позволяет рассматривать спиновую систему протонов каждого аминокислотного остатка, входящего в состав пептида, изолированно от других аминокислотных остатков и разнести сигналы в спектре 1H -ЯМР по мультиплетным типам аминокислотных остатков. Однако такая изолированность лишает возможности только по протонным спектрам отнести сигналы к определенному остатку в первичной структуре (за исключением тривиального случая, когда в пептиде имеется только один остаток данного мультиплетного типа протонной спиновой системы). Для преодоления этого ограничения и отнесения сигналов к определенному остатку в аминокислотной последовательности необходимо рассмотреть спиновую систему, содержащую ядра соседних остатков. Наиболее пригодными системами являются гетероядерные спиновые системы, составленные из ядер 1H и ^{13}C [6], принадлежащих соседним аминокислотным остаткам. Для этой же цели в принципе можно использовать гетероядерные спиновые системы ядер 1H и ^{15}N без изотопного обогащения ^{15}N .

Отнесение сигналов в спектре 1H -ЯМР к мультиплетному типу аминокислотного остатка

Первая стадия отнесения сигналов состоит в идентификации типов мультиплетных систем протонов аминокислотных остатков.

20 природных аминокислот, входящих в состав пептидов и белков, можно подразделить на типы протонных спиновых систем в зависимости от числа протонов в α -, β -, γ -, δ - и ϵ -положениях и от числа протонов при атоме азота (рис. 1).

Протоны при атоме азота. Отличительной характеристикой пролинового остатка является отсутствие протонов при атоме азота. Это приводит к отсутствию в спектре 1H -ЯМР отклика в области сигналов протонов NH при облучении пролинового протона $C^{\alpha}H$. Однако аналогичный эффект будет наблюдаться также для N -концевого остатка, в котором спин-спиновое взаимодействие протонов $H_3N^+-C^{\alpha}H$ не проявляется в спектре из-за быстрого обмена протонов N^+H_3 с растворителем. Различить эти остатки можно благодаря существованию характерной рН-зависимости сигнала $C^{\alpha}H$ N -концевого остатка ($\Delta\delta \sim -0,5$ м.д.) [2], наблюдающейся при увеличении рН водного раствора.

Протоны в α -положении. Только глициновый остаток содержит в этом положении 2 протона, остальные 19 аминокислотных остатков — по 1 протону. В глицине протоны $C^{\alpha}H_2$ взаимодействуют между собой с характерной константой геминального спин-спинового взаимодействия. В остальных аминокислотах протоны $C^{\alpha}H$ взаимодействуют с вицинальными протонами $C^{\beta}H$ боковой цепи. Таким образом, по количеству протонов в α -положении и их спин-спиновому взаимодействию можно отнести сигналы глицинового остатка в спектре 1H -ЯМР с помощью мультirezонансного режима.

Протоны в β -положении. 19 аминокислот, содержащих по 1 протону в α -положении, в зависимости от числа протонов в β -положении можно разбить на 3 группы: а) аланин содержит три протона в β -положении, б) 15 аминокислот содержат по 2 протона, в) треонин, изолейцин и валин — по 1 протону.

На основании различного количества протонов в β -положении однозначно можно отнести сигналы спиновой системы аланинового остатка.

Протоны в γ -положении. 15 аминокислот, содержащих по 1 протону в α -положении и по 2 протона в β -положении, в зависимости от числа γ -протонов можно разделить на 3 группы: а) цистеин (и цистин), гисти-

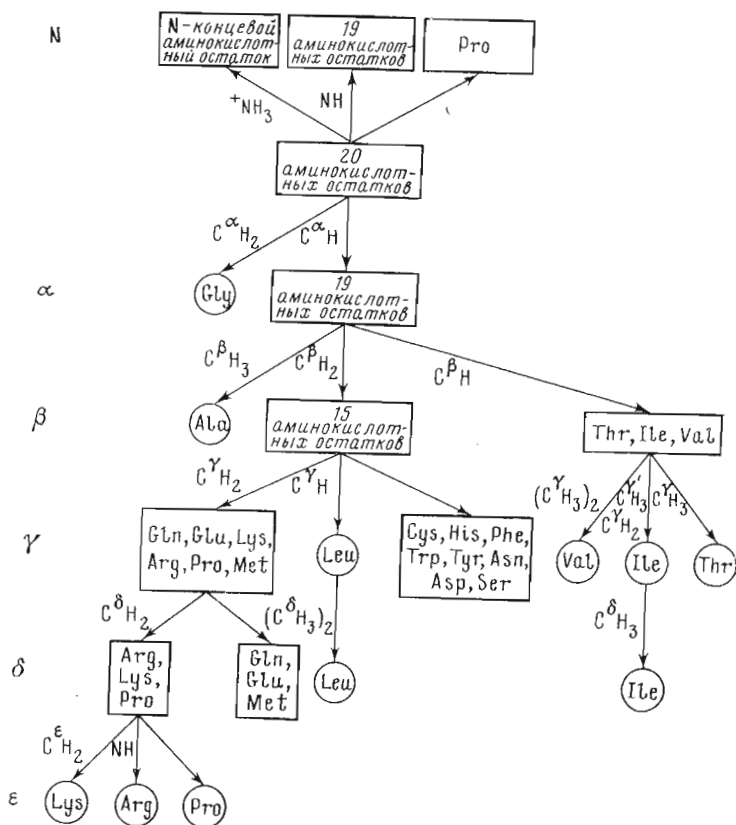


Рис. 1. Мультиплетные типы аминокислотных остатков в ^1H -ЯМР спектрах

диц, фенилаланин, триптофан, тирозин, аспарагин, аспарагиновая кислота и серин не содержат протонов в γ -положении, б) лейцин содержит 1 протон в γ -положении, в) глутамин, глутаминовая кислота, лизин, аргинин, пролин и метионин — 2 протона. Треонин, изолейцин и валин, содержащие по 1 протону в α - и β -положениях, также подразделяются в зависимости от числа γ -протонов на 3 группы: а) треонин содержит 3 протона в γ -положении, б) изолейцин — 5 протонов, в) валин — 6 γ -протонов от 2 групп $\text{C}^{\text{H}}\text{H}_3$.

На основании различий аминокислотных остатков по числу протонов в γ -положении могут быть отнесены сигналы спиновых систем лейцина, валина, изолейцина и треонина. Отнесению сигналов этих остатков в большей степени помогает наличие групп CH_3 в их боковой цепи, которые дают весьма характерные сигналы в области сильного поля. Например, отличительной чертой спектра спиновой системы изолейцина является триплетный сигнал от протонов группы $\text{C}^{\text{H}}\text{H}_3$; для лейцинового остатка наблюдаются интенсивные дублеты от двух групп $\text{C}^{\text{H}}\text{H}_3$.

Спиновая система аспарагиновой кислоты может быть выделена на основании характерной pH-зависимости сигнала $\text{C}^{\text{H}}\text{H}_2$ при увеличении pH водного раствора ($\Delta\delta \sim -0,25$ м.д.) [7].

Для отнесения сигналов протонов серинового остатка можно использовать то обстоятельство, что геминальная КССВ β -протонов серина, согласно данным, приведенным в работах [8, 9], имеет наименьшее абсолютное значение ($^2J_{\text{BB}}$ 10,0–13,0 Гц) по сравнению с аналогичными КССВ в аминокислотах подобного типа протоновой спиновой системы ($^2J_{\text{BB}}$ 13,0–17,5 Гц). Это отличие обусловлено эффектом электроотрицательности заместителя (группа OH при атоме C^{H} в серине), уменьшающим константу по абсолютной величине (см., например, обзор [10]).

Протоны в δ -положении. Глутаминовая кислота, глутамин, лизин, аргинин, пролин, метионин, содержащие по 1 протону в α -положении и по 2 протона в β - и γ -положениях, подразделяются по числу протонов в δ -положении на 2 группы: а) глутамин, глутаминовая кислота и метионин не имеют δ -протонов, б) лизин, аргинин и пролин имеют по 2 δ -протона.

Спиновая система глутаминовой кислоты может быть выделена на основании характерной рН-зависимости сигнала C^1H_2 при увеличении рН водного раствора ($\Delta\delta \sim -0,2$ м.д.) [7].

Протоны в ϵ -положении. Лизин, аргинин и пролин подразделяются по числу протонов в ϵ -положении на 3 группы: а) аргинин в ϵ -положении содержит протон NH , б) лизин имеет 2 протона в ϵ -положении, в) пролин не имеет ϵ -протонов. По этим признакам можно отнести сигналы названных остатков.

Деление аминокислот на типы спиновых систем может быть практически осуществлено, как это будет показано в следующем сообщении, с помощью техники гомоядерного мультирезонанса и разностной спектроскопии.

Приведенная выше дифференциация показывает, что в большинстве случаев имеется возможность отнесения сигналов спиновых систем к определенным типам аминокислотных остатков. Принципиально неразличимыми с точки зрения типа спиновых систем являются только две группы аминокислотных остатков: а) Cys, His, Phe, Trp, Tyr, Asn, б) Gln, Met.

Если в первичной последовательности полипептида содержится несколько одинаковых аминокислотных остатков, то отнесение сигналов к индивидуальному остатку невозможно при рассмотрении протонных спиновых систем. В этих случаях необходимо рассматривать гетероядерные спиновые системы.

Отнесение сигналов в спектре 1H -ЯМР к индивидуальному аминокислотному остатку

Рассмотрим гетероядерную ^{13}C -, 1H -спиновую систему полипептидной цепи, включающую протоны $C^\alpha H$ и $C^\beta H$ и ядро углерода C' (рис. 2). Значения констант ^{13}C - 1H в данной спиновой системе лежат в следующих пределах [4]: $^2J_{H-C^\alpha-^{13}C'} \sim 4,2-7,3$ Гц, $^3J_{^{13}C'-NC^\alpha-H} \sim 0-4,3$ Гц, $^3J_{H-C^\beta C^\alpha-^{13}C'} \sim 1,3-9,8$ Гц.

Для упрощения рассматриваемых спиновых систем эксперимент удобно проводить в растворе D_2O . При этом из рассмотрения выпадает спин-спиновое взаимодействие C' углеродных ядер с NH -протонами, что уменьшает число необходимых селективных частот облучения. Будем считать, что в спектре 1H -ЯМР пептида с известной аминокислотной последовательностью выполнено полное отнесение протонных сигналов $C^\alpha H$ и $C^\beta H$ к мультиплетным типам спиновых систем. Сравнивая спектры ^{13}C -ЯМР без развязки от протонов и с селективным подавлением протонов $C^\alpha H$ и $C^\beta H$ n -го остатка, относим в последнем дублетный сигнал углерода ^{13}C n -го остатка. Проводя затем серию экспериментов с дополнительным облучением (расщепление обусловлено спин-спиновым взаимодействием с протоном $C^\alpha H$ $(n+1)$ -го остатка) одного из сигналов в области $C^\alpha H$ протонного спектра, найдем сигнал от протона $C^\alpha H$ $(n+1)$ -го остатка и, следовательно, установим последовательность спиновых систем n -го и $(n+1)$ -го остатков. Затем аналогичными экспериментами можно обнаружить $(n+2)$ -й остаток и т. д. Определяя таким образом взаимосвязь протонных спиновых систем и сравнивая ее с известной аминокислотной последовательностью пептида, получим полное отнесение сигналов протонов в спектре 1H -ЯМР к индивидуальным аминокислотным остаткам. При этом эксперимент удобно начинать с облучения сигналов от протонов любого остатка, отнесение которого однозначно. Кроме того, одновременно с отне-

сением протонных сигналов производится отнесение сигналов от ядер $^{13}\text{C}'$ в карбонильной области спектра ^{13}C -ЯМР к индивидуальным аминокислотным остаткам. Остальные сигналы в спектре ^{13}C -ЯМР идентифицируются обычными приемами гетероядерного резонанса с селективным подавлением протонных сигналов.

Таким образом, в результате рассмотрения как протонных, так и гетероядерных спиновых систем, образованных ядрами ^{13}C и ^1H , можно провести полное отнесение сигналов протонов к индивидуальным аминокислотным остаткам. Ограничением при проведении подобных экспериментов являются некоторые случаи перекрывания сигналов, которые будут рассмотрены в следующих сообщениях. При этом возможность варьировать

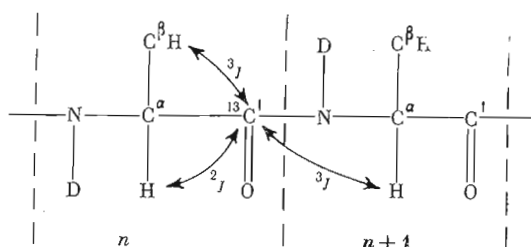


Рис. 2. Гетероядерная спиновая система ^1H - ^{13}C в пептидном фрагменте

pH среды, температуру и состав растворителя часто снимает эти ограничения.

Ограничением также являются случаи, когда значение константы $^3J_{\text{H}\alpha-\text{C}'(0)}$ близко к нулю и соответствующее расщепление не наблюдается в спектре. При этом для однозначного отнесения сигналов необходимо проводить эксперимент в растворе H_2O , используя константу $^2J_{\text{C}'(0)-\text{NH}}$, значение которой лежит в пределах 2,4–5,5 Гц [4]. Однако для проведения такого эксперимента необходимое число селективных радиочастотных полей для подавления спин-спинового взаимодействия возрастает.

Изложенное выше позволяет сформулировать специальные требования к ЯМР-спектрометру, необходимые для проведения экспериментов с биологическими объектами в гомо- и гетеромультрезонансных режимах (ГМР и ГТМР). Надо отметить, что, поскольку эксперимент с пептидами и белками проводится в водных растворах (H_2O или D_2O), применение указанной методики отнесения сигналов в ГМР усложняется наличием в спектре сильного сигнала растворителя. Для его подавления разработан ряд методов [11–20], среди которых одним из наиболее удобных благодаря простоте и эффективности является метод селективного насыщения сигнала растворителя радиочастотным полем перед неселективным радиоимпульсом, предназначенным для наблюдения спектра [11, 12, 19, 20]. Таким образом, для проведения экспериментов в ГМР необходимо: 1) наличие сильного радиочастотного облучающего поля для подавления сигнала растворителя в период времени, предшествующего импульсу, который возбуждает спектр, и временем выборки данных; 2) для ГМР и ГТМР наличие регулируемых по частоте и мощности радиочастотных полей во время выборки данных, предназначенных для селективного подавления спин-спинового взаимодействия протонов.

Для реализации указанных требований проведена модификация серийного спектрометра типа SC-300 Varian (США) с рабочей частотой 300 МГц для протонов [21]. В отличие от стандартной блок-схемы дополнительно использованы генераторы частоты $\Gamma_1, \Gamma_2, \dots, \Gamma_n$, состоящие из синтезаторов частоты типа Ч6-31 (СССР), синхронизированных от генератора опорной частоты (ГОЧ), и синтезаторных умножителей Ч6-2 (СССР) (рис. 3). В режиме ГМР для подавления сигнала растворителя использован мощ-

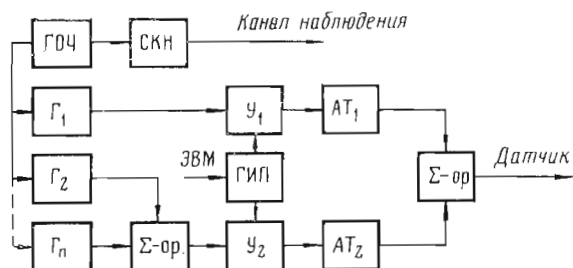


Рис. 3. Блок-схема модификации спектрометра типа SC-300 Varian: ГРЧ – генератор опорной частоты; Γ_1 , Γ_2 , Γ_n – генераторы частоты; СКН – синтезатор канала наблюдения; Σ -ор – сумматор; $У_1$, $У_2$ – усилители мощности; $АТ_1$, $АТ_2$ – аттенюаторы

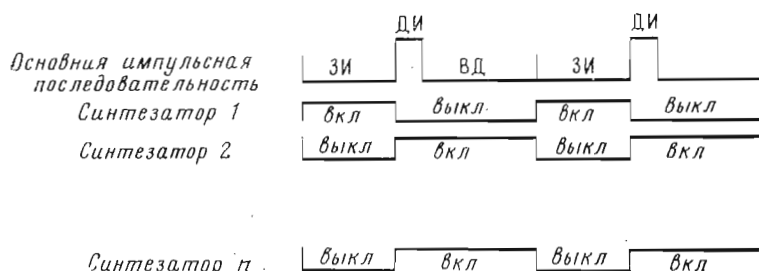


Рис. 4. Импульсная последовательность для экспериментов по мультирезонансу. Синтезатор 1 используется для подавления сигнала воды, синтезаторы 2, ..., n – для подавления спин-спинового взаимодействия. ЗИ – задержка импульса, ДИ – длительность импульса, ВД – время выборки данных

ный усилитель $У_1$ с аттенюатором $АТ_1$, который до модификации применялся для подавления спин-спинового взаимодействия гетероатомов с протонами. Для получения необходимой импульсной последовательности (рис. 4) изменена схема генератора импульсной последовательности (ГИП), управляющего усилителями мощности $У_1$ и $У_2$. Калибровка полей, применяемых для селективного подавления спин-спинового взаимодействия в ГМР и ГТМР, осуществлена по методикам двойного резонанса [22]. В результате модификации спектрометра получена возможность использовать необходимое число радиочастотных полей для проведения экспериментов в режимах ГМР и ГТМР.

Разработанные методы успешно применены для отнесения сигналов в спектрах ^1H -ЯМР ряда биологически активных соединений. В следующих сообщениях будут изложены результаты применения разработанной схемы отнесения сигналов для олигопептидного нейротоксина апамина (M 2038, 18 аминокислотных остатков, две дисульфидные связи).

ЛИТЕРАТУРА

1. Овчинников Ю. А., Иванов В. Т., Шкроб А. М. (1974) Мембрано-активные комплексы, «Наука», М.
2. Wüthrich K. (1976) NMR in Biological Research: Peptides and Proteins, American Elsevier, New York.
3. Bystrov V. F., Arseniev A. S., Gavrilov Yu. D. (1978) J. Magn. Res., 30, 151–184.
4. Bystrov V. F. (1976) Progress in NMR Spectroscopy, 10, 41–81.
5. Ostlund N. S., Pruniski (1974) J. Magn. Res., 15, 549–551.
6. Bystrov V. F., Gavrilov Yu. D., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. (1977) Eur. J. Biochem., 78, 63–82.
7. Bundi A., Wüthrich K. (1979) Biopolymers, 18, 285–297.
8. Hruby V. J. (1974) in: Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins (Weinstein B., ed.), vol. 3, Marcell Dekker, New York.

9. Roberts G. C. K., Jardetzky O. (1970) Adv. in Protein Chem. 24, 447-451.
10. Быстров В. Ф. (1972) Успехи химии, 41, 512-553.
11. Jesson J. P., Meakin P., Knissel G. (1973) J. Amer. Chem. Soc., 95, 618.
12. Campbell I. D., Dobson C. M., Hminet G., Williams R. J. P. (1974) FEBS Lett., 49, 115-119.
13. Patt S. L., Sykes B. D. (1972) J. Chem. Phys., 56, 3182-3184.
14. Benz F. W., Feeney J., Roberts G. C. K. (1972) J. Magn. Res., 8, 114-121.
15. Mooberry E. S., Krugh T. R. (1975) J. Magn. Res., 17, 128-131.
16. Tomlinson B. L., Hill H. D. W. (1973) J. Chem. Phys., 59, 1775-1784.
17. Dadok J., Sprecher R. F. (1974) J. Magn. Res., 13, 243-248.
18. Gupta R. K., Ferretti J. A., Becker E. D. (1974) J. Magn. Res., 13, 275-290.
19. Schaefer J. (1972) J. Magn. Res., 6, 670-671.
20. Bleich H. E., Glasel J. A. (1975) J. Magn. Res., 18, 401-405.
21. Gurevich A. Z., Afanasiev V. A., Arseniev A. S., Okhanov V. V. (1978) XXth Ampere Congress. Abstracts, Tallinn, Di413.
22. Липмаа Э. Т. (1967) Ж. структ. химии, 8, 717-780.

Поступила в редакцию
3.VII.1979

MULTIRESONANCE DECOUPLING APPROACH TO TOTAL SIGNAL ASSIGNMENT IN ^1H - AND ^{13}C NMR SPECTRA OF PEPTIDES AND PROTEINS

BYSTROV V. F., OKHANOV V. V., ARSENIYEV A. S., AFANASIEV V. A., GUREVICH A. Z.

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

Multiplet proton signal patterns of amino acid residues could be divided into distinct groups of spin system by successive homonuclear proton decoupling and thus assigned to the individual type. For their assignment to specific position in the primary structure of polypeptide molecule it is proposed to use heteronuclear selective decoupling $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ technique with detection of carbonyl signals in the ^{13}C NMR spectrum and irradiation of preselected proton resonance lines.