



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 6 • № 6 • 1980

УДК 547.96.02+543.422.23+547.993

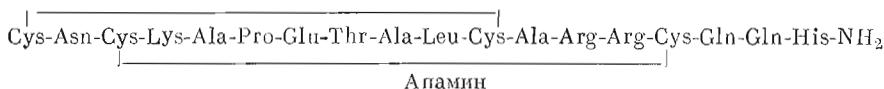
ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА АПАМИНА В РАСТВОРЕ. КОНФОРМАЦИОННЫЙ ЯМР-АНАЛИЗ

Оханов В. В., Афанасьев В. А., Гуревич А. З.,
Елякова Е. Г., Мирошников А. И., Быстров В. Ф.,
Овчинников Ю. А.

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

В спектре ^1H -ЯМР пейротоксина из яда пчелы, апамина, с помощью гомо- и гетероядерного $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -мультирезонанса отнесено большинство сигналов к аминокислотным остаткам в соответствии с первичной структурой молекулы. Это позволило, изучая характеристики протонных сигналов, определить микроизменение соответствующих функциональных групп. Изучена рН-зависимость химических сдвигов сигналов апамина и продуктов его химической модификации [Ac-Cys^1]апамина и [$\text{Org}(\text{Pyr})^{13}$, $\text{Org}(\text{Pyr})^{14}$]апамина. На основании этих данных обнаружены ряд невалентных контактов между аминокислотными остатками и выяснено пространственное расположение ионогенных групп. Совокупность полученных результатов дала возможность построить модель пространственной структуры апамина в растворе.

Октадекапептид апамин, выделенный из яда медоносной пчелы *Apis mellifera*, является пейротоксином, действующим на центральную нервную систему [1—4] и оказывающим угнетающее действие на неадренергические тормозные потенциалы гладкомышечных клеток желудка млекопитающих [5, 6]. В последнее время апамин успешно используется в пейрофизиологии как инструмент изучения механизмов передачи нервного возбуждения.



Для выяснения связи между структурой и функцией апамина необходимо определить пространственное строение молекулы в растворе и роль отдельных ее фрагментов в формировании доминирующего конформационного состояния.

Ранее из спектров кругового дихроизма было найдено [7], что молекула апамина обладает устойчивой пространственной структурой. Изменение рН, полярности среды, добавление денатурирующих агентов, а также химическая модификация по функциональным группам апамина не приводят к заметному изменению конформации полипептида в растворах.

В данной работе проведено исследование апамина с помощью спектроскопии ЯМР, являющейся в настоящее время одним из наиболее эффективных методов установления пространственного строения пептидных веществ в растворе [8—10].

Таблица 1

Протонные спиновые системы аминокислотных остатков апамина

Система	Остаток	Система	Остаток
NH-C ^α H-CH ₃	Ala ^{5, 9, 12}	NH-C ^α H-C ^β H ₂ -C ^γ H ₂ -C ^δ H ₂ -NH	Arg ^{13, 14}
NH-C ^α H-C ^β H-CH ₃	Thr ⁸	NH-C ^α H-C ^β H ₂ -C ^γ H ₂ -C ^δ H ₂ -C ^ε H ₂ -X	Lys ⁴
O			
NH-C ^α H-C ^β H ₂ -X	Asn ² , Cys ^{3, 11, 15} , His ¹⁸	N-C ^α H-C ^β H ₂ C ^δ H ₂ -C ^γ H ₂	Pro ⁶
NH-C ^α H-C ^β H ₂ -C ^γ H(CH ₃) ₂	Leu ¹⁰	N-C ^α H-C ^β H ₂ -X	
NH-C ^α H-C ^β H ₂ -C ^γ H ₂ -X	Glu ⁷ , Gln ^{16, 17}	Cys ¹	

Отнесение сигналов ¹Н-ЯМР

При использовании спектроскопии ЯМР для решения структурных задач первым и ключевым этапом является отнесение сигналов к определенным аминокислотным остаткам. Этим достигается однозначное соотнесение измеряемых параметров сигналов ЯМР (константы спин-спинового взаимодействия, зависимость химического сдвига от температуры и pH среды, кинетика дейтерообмена), дающих сведения о микроокружении и внутримолекулярном взаимодействии отдельных атомов и групп, с положением соответствующих ядер в химической структуре молекулы.

Первая стадия отнесения заключается в выделении в спектре ¹Н-ЯМР сигналов, отвечающих отдельным типам остатков. Эта задача была решена нами с помощью метода гомоядерного многочастотного резонанса на основе классификации аминокислотных остатков по типам спиновых мультиплетов [11]. Как видно из структуры молекулы апамина, аминокислотные остатки, входящие в его состав, можно отнести к 9 типам спиновых систем, представленным в табл. 1. Для ряда сигналов отнесение было проведено ранее с помощью гомоядерного мультирезонанса [10]. Последующие эксперименты позволили получить отнесение сигналов других аминокислотных остатков в апамине.

На рис. 1 представлено отнесение протонных сигналов самой большой спиновой системы NH-C^αH-C^βH₂-C^γH₂-C^δH₂-C^εH₂-X лизинового остатка. При облучении сигнала C^εH₂ (3,30 м. д.), выделенного по характерной pH-зависимости его химического сдвига [12], в разностном спектре наблюдается слабый отклик от сигналов C^δH₂ (1,95 м. д.). Если из спектра с облучением в области сигналов C^γH₂ (1,75 м. д.) вычесть спектр с одновременным облучением сигналов C^δH₂ и C^εH₂, то в разностном спектре наблюдается характерный синглет (1,95 м. д.), соответствующий изохронным протонам C^δH₂. Появление этого синглета в разностном спектре свидетельствует о принадлежности обнаруженных сигналов C^γH₂ (3,30 м. д.), C^δH₂ (1,95 м. д.) и C^εH₂ (1,75 м. д.) одной спиновой системе. При облучении сигналов C^γH₂ в разностном спектре наблюдаются слабые отклики от сигналов C^δH₂ (1,95 м. д.) и C^εH₂ (2,12 м. д.). Если из спектра с облучением сигналов C^γH₂ (1,75 м. д.) вычесть спектр с одновременным облучением сигналов C^δH₂ и группы сигналов C^αH (4,50 м. д.), найденной путем подбора частоты облучения, то в разностном спектре наблюдается синглет, соответствующий сигналу изохронных протонов C^δH₂ (2,12 м. д.). Этот эксперимент связывает ранее обнаруженные сигналы C^εH₂, C^δH₂ и C^γH₂ и один из сигналов C^αH в единую спиновую систему.

Отнесение сигнала NH (8,28 м. д.) было проведено в растворе H₂O (рис. 1) (методику мультирезонансного подавления для растворов пептидов в H₂O см. в [11]). При облучении группы сигналов C^αH (4,50 м. д.) в области сигналов NH сразу несколько сигналов переходят из дублетов в синглеты. Только последовательное облучение каждого из этих сигналов

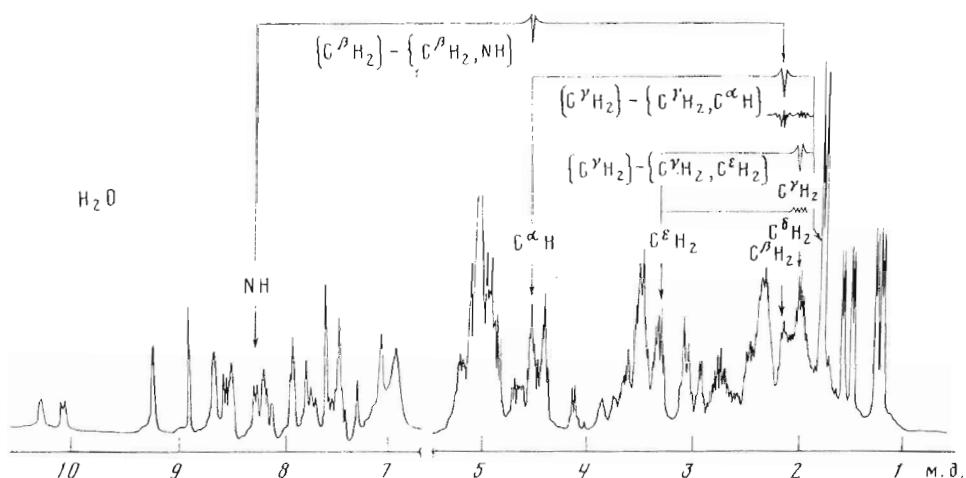


Рис. 1. Отнесение сигналов протонов к спиновой системе NH-C^αH-C^βH₂-C^γH₂-C^δH₂-C^εH₂-лизинового остатка в 300-МГц спектре ¹Н-ЯМР апамина. Слева — область сигналов NH (20 мМ, H₂O, pH 3,4; 32° С), справа — область сигналов CH (10 мМ, D₂O, pH* 3,4; 32° С)

совместно с сигналом C^δH₂ (2,12 м. д.) дает возможность выбрать сигнал NH, соответствующий рассматриваемой спиновой системе. При одновременном облучении сигнала C^δH₂ (2,12 м. д.) и сигнала NH при 8,28 м. д. в разностном спектре наблюдается переход сигнала C^αH в синглет (рис. 1). Этим завершается отнесение сигналов протонов спиновой системы NH-C^αH-C^βH₂-C^γH₂-C^δH₂-C^εH₂-X, которая, согласно аминокислотной последовательности апамина, принадлежит единственному остатку лизина в 4-м положении полипептидной цепи.

Аналогичным образом в спектре ¹Н-ЯМР апамина все сигналы были отнесены к определенным мультиплетным типам аминокислотных остатков (табл. 1). Если полипептид содержит только один аминокислотный остаток с данным типом мультиплетной структуры, то отнесение этих сигналов в соответствии с первичной структурой очевидно. В молекуле апамина такими остатками являются Thr⁸, Leu¹⁰, Lys⁴, Pro⁶ и Cys¹. В остальных случаях сигналы протонов удалось отнести либо к мультиплетному типу (Asn², Cys^{3,11,15}, His¹⁸ и Glu⁷, Gln^{16,17}), либо к типу аминокислотного остатка (Ala^{5,9,12} и Arg^{13,14}) (табл. 1).

Вторая, окончательная стадия отнесения сигналов состоит в отнесении по первичной структуре полипептида. Эта задача решена с помощью специально разработанного метода гетероядерного мультирезонанса ¹³C{¹H} [11] в спиновой системе, образованной ядрами двух соседних аминокислотных остатков — протонами C^αH и C^βH и карбонильным углеродом ¹³C одного остатка и протоном C^γH следующего в полипептидной цепи остатка. Наблюдение за подавлением расцепления в карбонильной области спектра ¹³C-ЯМР в режиме селективного многочастотного облучения протонов позволяет связать отдельные протонные мультиплетные системы с последовательностью аминокислотных остатков в молекуле и в результате однозначно приписать протонные и карбонильные ¹³C-сигналы определенному положению в полипептидной цепи [11].

В качестве примера применения гетероядерного мультирезонанса приведем отнесение сигналов Ala⁵. Согласно аминокислотной последовательности, в апамине содержится три аланиновых остатка: Ala^{5,9,12}. При отнесении сигналов с помощью гомоядерного подавления в спектре ¹Н-ЯМР были обнаружены три спиновые системы, относящиеся к мультиплетному типу аланинового остатка (рис. 2). Однако отнести эти спиновые системы

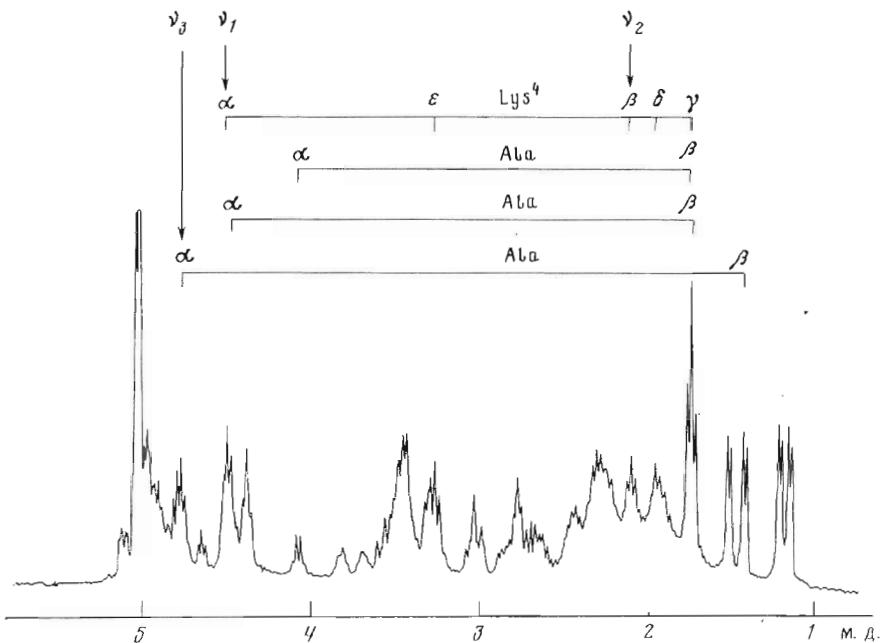


Рис. 2. Высокопольная часть протонных спиновых систем остатков Lys⁴ и Ala^{5,9,12} в аланине (10 мМ, D₂O, pH* 6,75; 32° C)

к определенному положению в первичной структуре при рассмотрении только протонных спиновых систем невозможно. Для отнесения протонных сигналов спиновой системы Ala⁵ методом гетероядерного мультирезонанса можно использовать то обстоятельство, что соседним с Ala⁵ остатком является Lys⁴, единственный остаток данного мультиплетного типа, протонные сигналы которого были отнесены однозначно в протонном спектре (рис. 1 и 2). При одновременном облучении протонных сигналов C²H и C³H₂ лизинового остатка в карбонильной области спектра ¹³C наблюдается сужение одного из сигналов (рис. 3). Очевидно, что этот сигнал при 174,04 м. д. отвечает карбонильному углероду Lys⁴, а остаточное дублетное расщепление обусловлено взаимодействием с протоном C²H остатка Ala⁵. При настройке дополнительной частоты облучения на протонные сигналы C²H аланиновых остатков найдено такое ее значение, при котором дублетный сигнал ¹³C=O остатка Lys⁴ переходит в синглет. Тем самым выделено положение сигнала C²H от остатка Ala⁵ и всего его протонного мультиплета в целом.

Аналогичным образом методом гетероядерного мультирезонанса отнесены протонные сигналы большинства других спиновых систем одинакового мультиплетного типа к индивидуальным аминокислотным остаткам. На рис. 4 показаны области спектра ¹H-ЯМР аланина с указанием отнесения сигналов по первичной структуре. Химические сдвиги протонных сигналов приведены в табл. 2. Следствием проведенных гетероядерных экспериментов является также отнесение сигналов ¹³C в карбонильной области спектра аланина (рис. 5).

Сложности в отнесении сигналов возникают при перекрывании сигналов от протонов различных спиновых систем одинакового мультиплетного типа. Так, слишком незначительные различия химических сдвигов сигналов от протонов C²H и других протонов боковой цепи остатков Arg¹³ и Arg¹⁴ не позволяют соотнести соответствующие сигналы NH, имеющие различные химические сдвиги, с индивидуальными сигналами в пределах одной спиновой системы. Подобные экспериментальные трудности обусловили то, что протонные сигналы a, b, c, c', d и d' (рис. 4) от шести амино-

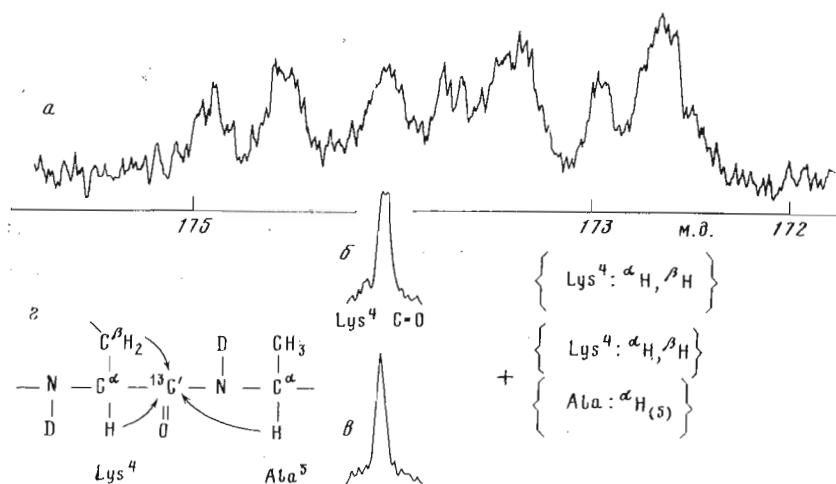


Рис. 3. Отнесение протонной спиральной системы Ala^5 . Часть карбонильной области сигналов ^{13}C -спектра апамина (75 МГц, 50 мМ, D_2O , $\text{pH}^* 6,75$; 32°C): *a* — без шумовой развязки от протонов, *б* — с селективным облучением протонов C^αH и C^βH лизинового остатка, *в* — при тех же условиях, что и «*б*», но с дополнительным облучением сигнала C^αH при 4,76 м.д. одного из трех аланинов, *г* — гетероядерная спиральная система соседних аминокислотных остатков Lys^4 и Ala^5

кислотных остатков отнесены лишь к мультиплетным типам и пока не отнесены к индивидуальным остаткам (табл. 2).

Непосредственно в процессе отнесения сигналов были измерены константы спин-спирального взаимодействия вицинальных протонов $\text{HN}-\text{C}^\alpha\text{H}$ и $\text{HC}^\alpha-\text{C}^\beta\text{H}$ (табл. 2), а также оценены предельные значения гетероядерных констант $^{13}\text{C}'-\text{N}-\text{C}^\alpha\text{H}$, которые из-за своих небольших значений не всегда проявлялись в спектрах ^{13}C -ЯМР в виде четких расщеплений. Как известно, названные константы взаимодействия позволяют определить конформационное состояние пептидных фрагментов по связям $\text{N}-\text{C}^\alpha$ и $\text{C}^\alpha-\text{C}^\beta$ (см., например, обзор [43]). Эти сведения использованы при анализе пространственной структуры апамина с помощью конформационного расчета энергий (статья готовится к печати).

Проведенное отнесение сигналов по аминокислотным остаткам предоставило достаточное количество репортерных сигналов для поиска внутримолекулярных взаимодействий и контактов, необходимых для определения пространственной конфигурации основной цепи и ориентации боковых цепей апамина.

Зависимость химических сдвигов протонов апамина от pH среды

Для определения внутримолекулярных контактов и взаимодействия между атомами и группами атомов в молекуле апамина изучена pH -зависимость сигналов протонов самого апамина и ряда продуктов его химической модификации. Этот метод получения структурной информации хорошо зарекомендовал себя ранее при изучении пространственной структуры пептидов и белков в растворе методом спектроскопии ЯМР [10, 14–17].

Согласно аминокислотной последовательности, в апамине содержатся следующие ионогенные группы: α -аминогруппа Cys^1 , ε -аминогруппа Lys^4 , карбоксильная группа Glu^7 , гуанидиновые группы Arg^{13} и Arg^{14} и имидазольная группа His^{18} . В обычно исследуемом диапазоне значений pH 1–12 гуанидиновые группы не изменяют своего ионизационного состояния. Значения pK_a остальных ионогенных групп были определены по зависимости химических сдвигов протонных сигналов от значения pH водного раствора.

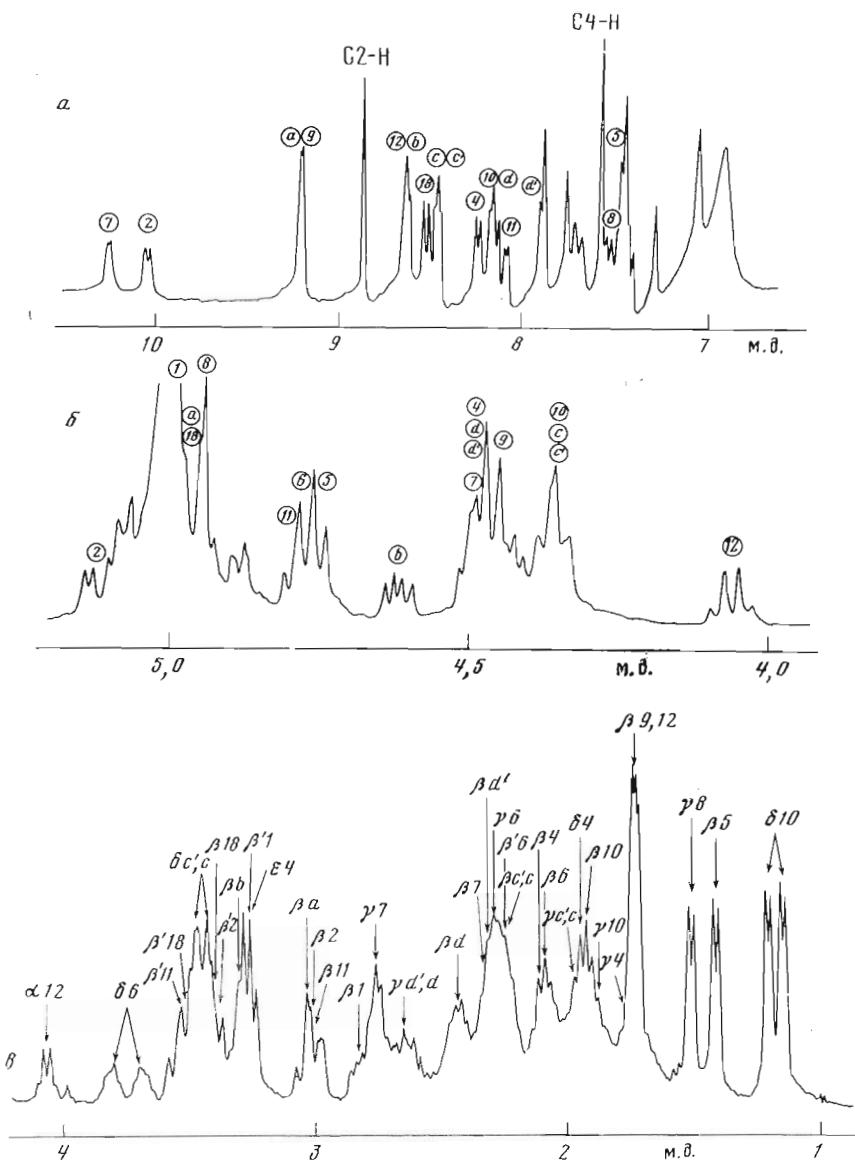


Рис. 4. Отнесение сигналов в спектре ^1H -ЯМР апамина, полученное в результате экспериментов по гомо- и гетероядерному мультирезонансу. Нумерация сигналов соответствует положению остатка в аминокислотной последовательности молекулы апамина. Сигналы шести спиновых систем, не отнесенны к индивидуальным остаткам, обозначены a , b , c , c' , d , d' . Греческие буквы применены для обозначения сигналов от протонов при соответствующем углеродном атоме боковой цепи. a — область сигналов от протонов NH ($10 \text{ mM}, \text{H}_2\text{O}, \text{pH } 3.4; 32^\circ\text{C}$); b — область сигналов от протонов C^αH ($10 \text{ mM}, \text{D}_2\text{O}, \text{pH } 5.1; 32^\circ\text{C}$); c — высокопольная область спектра апамина ($10 \text{ mM}, \text{D}_2\text{O}, \text{pH } 6.7; 32^\circ\text{C}$)

В принципе полное отнесение сигналов в протонном спектре позволяет наблюдать любые изменения их химических сдвигов. Однако в условиях сильного перекрывания сигналов высокопольной области при изучении pH -зависимости химических сдвигов (рис. 6) мы ограничимся рассмотрением только отдельных сигналов, либо изменяющих свои химические сдвиги на значительную величину, либо имеющих простую мультиплетную структуру. В табл. 3 представлены параметры титрования $\Delta\delta$ ($\Delta\delta = \delta_{\text{ан}} - \delta_{\text{а}}$) и $\text{p}K_a$ для наблюдаемых протонных сигналов апамина. Сравнительно большие изменения химических сдвигов испытывают сигналы $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ и $\text{C}^\delta\text{H}_2$

Таблица 2

Химические сдвиги и вицинальные константы спин-спинового взаимодействия в спектре ^1H -ЯМР апамина

Остаток	δ_{NH} , м.д. (рН 2,4; 26° С)	${}^3J_{\text{HN}-\text{C}^\alpha\text{H}}$, Гц	$\delta_{\text{C}^\alpha\text{H}}$, м.д. (рН * 2,0; 32° С)	${}^3J_{\text{H}^\alpha\text{C}-\text{C}^\beta\text{H}}$, Гц	$\delta_{\text{C}^\beta\text{H}}$, м.д. (рН * 2,0; 32° С)	$\delta_{\text{др. протоны}}$, м.д. (рН * 2,0; 32° С)
Cys ¹	—	—	5,00 ^{2*}	7,8; 7,8	3,40 ^{2*} 3,00	—
Asn ²	9,42	9,5	5,45	11,2; 4,2	3,38 3,03	—
Lys ⁴	8,30	7,6	4,47		2,41	C^γ 1,73 C^δ 1,93 C^ϵ 3,26
Ala ⁵	7,48	6,8	4,80	6,1	1,43	—
Pro ⁶	—	—	4,83	6,2; 6,2	2,26 2,11	C^γ 2,35 ^{4*} C^δ 3,85 3,73
Glu ⁷	9,40	6,9	4,67	9,6; 4,4	2,61 2,45	C^γ 2,92
Thr ⁸	7,65	8,5	4,95	1,9	4,88	C^γ 1,53
Ala ⁹	9,22	2,7	4,41	6,1	1,71	—
Leu ¹⁰	8,24	5,5	4,36		1,96 ^{4*}	C^γ 1,88 C^δ 1,20 1,14
Cys ¹¹	8,04	5,9	4,85	7,6; 7,6	3,56 3,03	—
Ala ¹²	8,72	3,0	4,08	6,1	1,71	—
His ¹³	8,57	7,9	4,99 ^{2*}	8,6; 6,1	3,61 3,46	C^γ 8,90 C^δ 7,60
Cys ^{13, 15} <i>a</i>	9,27	5,2	4,96 ^{3*}	11,9; 2,8	3,06 2,99	—
<i>b</i>	8,65	5,4	4,65	9,6; 4,2	3,33	—
Arg ^{13, 14} <i>c</i>	8,57	3,5	4,36	}	2,24 ^{4*}	C^γ 2,02 ^{4*} C^δ 3,47
<i>c'</i>	8,52	4,2	4,36		2,24 ^{4*}	C^γ 2,02 ^{4*} C^δ 3,43
Gln ^{16, 17} <i>d</i>	8,20	7,1	4,47	}	2,40 ^{4*}	C^γ 2,67 ^{4*}
<i>d'</i>	7,94	6,8	4,47		2,32 ^{4*}	C^γ 2,71 ^{4*}

^{1*} Значения констант не приводятся в случаях сильного перекрывания сигналов.

^{2*} Значение химического сдвига вычислено по рН*-зависимости.

^{3*} Химический сдвиг измерен при 50° С.

^{4*} Химический сдвиг соответствует центру мультиплета неэквивалентных протонов CH_2 .

остатка Lys⁴ в диапазоне рН 8,5—12,5 с перегибом при рН 10,8, характерным для pK_a ε-аминогруппы лизинового остатка [18, 19]. Величины $\Delta\delta$ (табл. 3) этих сигналов также близки к значениям, полученным при титровании модельных соединений, содержащих остатки лизина [18, 19]. В остальном диапазоне значений рН сигналы протонов $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ и $\text{C}^\delta\text{H}_2$ остатка Lys⁴ не изменяют свои химические сдвиги.

Если учесть, что в спектре ^1H -ЯМР не найдено других сигналов, испытывающих изменение химического сдвига в области рН 10—11, то можно сделать вывод об отсутствии невалентных контактов ε-аминогруппы Lys⁴ с боковыми цепями остальных аминокислотных остатков.

Значительные изменения химических сдвигов испытывают сигналы протонов C^βH_2 остатка Cys¹ в области рН 6—7. Однако из-за перекрытия сигналов в высокопольной области спектра точное значение pK_a N-концевой аминогруппы было вычислено по кривым титрования для сигнала

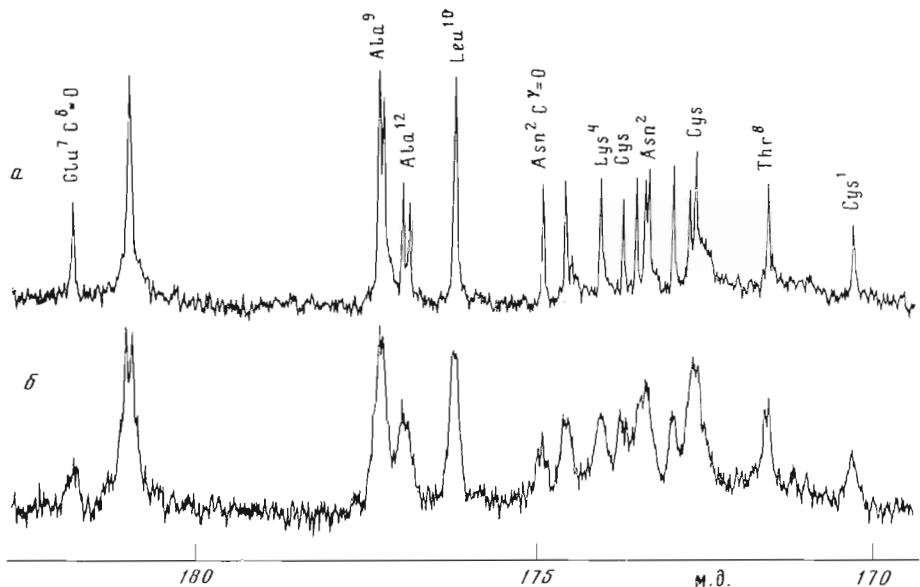


Рис. 5. Отнесение карбонильных сигналов в спектре ^{13}C -ЯМР апамина, полученное в результате экспериментов по гетероядерному мультирезонансу (75 МГц, 50 мМ, D_2O , $\text{pH}^* 6,75$; 32°С): *a* — спектр с шумовой развязкой от протонов, *b* — без шумовой развязки

$\text{C}^{\alpha}\text{H}$ -протона Cys^1 (см. ниже). Величины $\Delta\delta$ 0,32 и 0,29 м.д. для сигналов протонов $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ остатка Cys^1 (табл. 3) близки к значениям, полученным в модельных соединениях для N-концевого аминокислотного остатка [20].

Значение $\text{p}K_a$ 3,6 карбоксильной группы Glu^7 , полученное из смещения сигнала $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ остатка Glu^7 при pH -титровании, несколько меньше, чем обычное значение $\text{p}K_a 4,3 \pm 0,1$ [19]. Величина $\Delta\delta$ 0,14 м.д. для этого сигнала также несколько занижена (табл. 3) по сравнению с нормальным $\Delta\delta$ 0,23 м.д. [19] из-за влияния соседней положительно заряженной группы (см. ниже).

При рассмотрении кривых pH -титрования сигналов высокопольной области спектра (рис. 6) обращают на себя внимание перегибы как для сигнала $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ остатка Glu^7 , так и для одного из сигналов $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ остатка Cys^1 при $\text{pH}^* 3,6$ и в области $\text{pH}^* 6-7$. Это дает основание предполагать пространственную сближенность α -аминогруппы и карбоксильной группы остатков Cys^1 и Glu^7 , удаленных друг от друга в полипептидной цепи. В этом случае должно наблюдаться отклонение $\text{p}K_a$ этих групп от стандартных значений, обусловленное взаимным влиянием зарядов: отрицательный заряд карбоксильной группы должен повышать $\text{p}K_a$ α -аминогруппы, а положительный заряд α -аминогруппы — понижать $\text{p}K_a$ карбоксильной группы.

Перегиб для сигналов $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ одного из глутаминов в области $\text{pH}^* 6-7$ свидетельствует о пространственной сближенности боковой цепи этого аминокислотного остатка с ионогенной группой, имеющей $\text{p}K_a$ в этой области pH^* . В случае апамина такой группой может быть либо имидазольное кольцо His^{18} , либо α -аминогруппа Cys^1 . Однозначное отнесение эффекта проведено по спектрам ^1H -ЯМР модифицированного аналога — [Asp-Cys^1]апамина (см. ниже).

Сигналы от протонов $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ остатков Arg^{13} и Arg^{14} , $\text{C}^{\beta}\text{H}_3$ остатка Leu^{10} и $\text{C}^{\beta}\text{H}_3$ — Ala^9 не меняют свои химические сдвиги в исследованном диапазоне pH^* (рис. 6), что указывает на их удаленность от ионогенных групп. Слабое влияние титрования карбоксильной группы испытывает сигнал $\text{C}^{\beta}\text{H}_3$ остатка Thr^8 , а также сигналы $\text{C}^{\beta}\text{H}_3$ остатков Ala^{12} и Ala^5 , которые, кроме того, изменяют свои химические сдвиги в области $\text{pH}^* 6-7$.

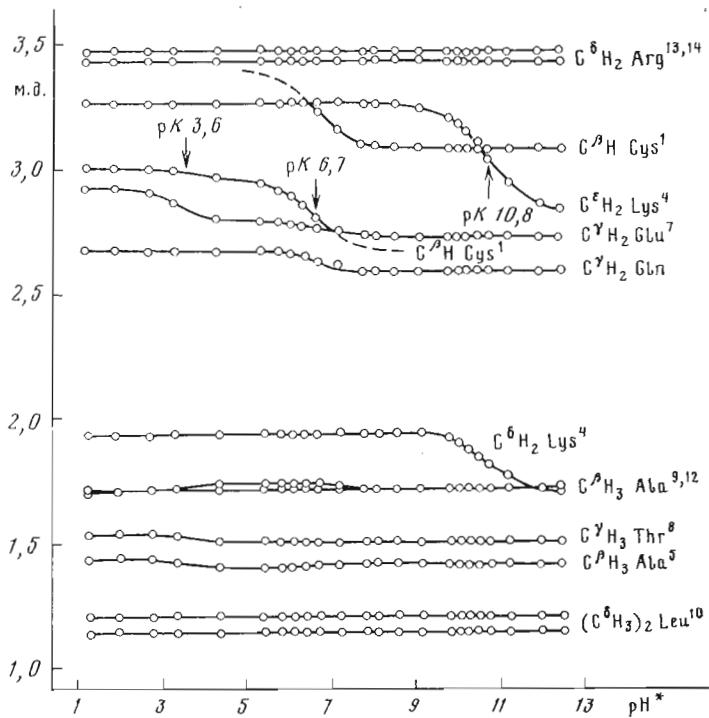


Рис. 6. pH*-Зависимость химических сдвигов протонных сигналов в высокопольной области спектра апамина (10 mM, D₂O, 32°C)

Сравнение рис. 7а и б свидетельствует о высокой температурной стабильности молекулы апамина, что было ранее обнаружено из спектров кругового дихроизма [7] *. Единственным сигналом, который изменяет свой химический сдвиг при увеличении температуры, является сигнал C^εH остатка Glu⁷. При этом увеличение температуры вызывает уменьшение значения $\Delta\delta$ (с 0,22 м.д. при 32°C до 0,16 м.д. при 50°C), которое при обеих температурах настолько аномально велико, что превышает $\Delta\delta$ сигнала C^εH остатка Glu⁷ (табл. 3). Причины этих аномалий будут обсуждены ниже.

Как уже было упомянуто, значение pK_a 6,7 α -аминогруппы Cys¹ вычислено по кривой титрования сигнала C^αH этого остатка. Это значение несколько завышено по сравнению с pK_a 6,3 α -аминогруппы окситоцина — пептидного гормона, содержащего дисульфидную связь 1—6 [21]. Как и заниженное значение pK_a для Glu⁷, это подтверждает взаимную пространственную сближенность α -аминогруппы Cys¹ и карбоксильной группы Glu⁷. Величина $\Delta\delta$ 0,70 м.д. сигнала C^εH остатка Cys¹ (табл. 3) совпадает со значениями, полученными для модельных соединений [20].

Отсутствие изменений в химических сдвигах сигналов от протонов C^εH в области pH* 8,5–12,5 (рис. 7а) свидетельствует об удаленности ε-аминогруппы Lys⁵ от основной цепи молекулы.

Таким образом, изучение поведения протонных сигналов в высокопольной и C^εH-областиях ¹H-ЯМР-спектра при pH-титровании апамина позволяет сделать следующие выводы о его пространственном строении:

а) ε-аминогруппа Lys⁵ удалена от основной цепи молекулы и не имеет контактов с боковыми цепями других аминокислотных остатков,

* Необходимость титрования при двух температурах обусловлена частичным перекрыванием сигналов C^εH с остаточным сигналом воды (HOD). При изменении температуры химический сдвиг сигнала HOD меняется и становится возможным наблюдать титрование всех сигналов C^εH.

Таблица 3

Изменения химических сдвигов протонов при титровании и значения pK_a апамина^{1*}

Остаток	NH		$C^\alpha H$		Другие протоны		
	$\Delta\delta$, м. д. (26° C)	pK_a	$\Delta\delta$, м. д. (32° C)	pK_a	$\Delta\delta$, м. д. (32° C)	pK_a	
Cys ¹			2*	3,6	C ^b	2*	3,6
	0,77	6,7	0,70 0,04 ^{3*}	6,7	C ^{b'}	0,32 0,04 0,29	6,7 3,6 6,7
Asn ²	-1,17 0,77	3,6 6,7	0,03 0,04 ^{3*}	3,6 6,7			
Lys ³	0,04 -0,03	3,6 6,7	2*		C ^b	0,23 0,43	10,8 10,8
Ala ⁵	0,07 -0,09	3,6 6,7	0,05 -0,01	3,6 6,7	C ^b	0,03 -0,01	3,6 6,7
Pro ⁶			0,05	3,6			
Glu ⁷	-1,64 0,61	3,6 6,7	0,22 2*	3,6 6,7	C ^b	0,14 0,06	3,6 6,7
Thr ⁸	0,22 -0,06	3,6 6,7	Нет изменения		C ^b	0,03	3,6
Ala ⁹	-0,04 0,07	3,6 6,7	-0,05	3,6	C ^b	Нет изменения	
Leu ¹⁰	0,05	6,7	2*		C ^b	То же	
Cys ¹¹	-0,17 -0,04	3,6 6,7	0,06	3,6			
Ala ¹²	0,07 0,02	3,6 6,7	0,02	3,6	C ^b	-0,03 0,02	3,6 6,7
His ¹³	0,04 0,20	3,6 6,6	2*		C ^b	0,97	6,6
			0,16	6,6	C ^b	0,35	6,6
Cys ^{3, 15} a	0,02	3,6	-0,02 ^{3*}	3,6			
	0,42	6,7	0,02 ^{3*}	6,7			
b	-0,06	3,6	0,03	3,6			
			-0,01	6,6			
Arg ^{13, 14} c	0,08	3,6	2*		C ^b	Нет изменения	
	-0,04	3,6	2*		C ^b	То же	
	0,05	6,7					
Gln ^{15, 16} d	Нет изменения		2*		C ^b	0,08	
	То же		2*		C ^b	6,6	Нет изменения

* Положительные значения $\Delta\delta$ отвечают смещению сигналов в сильное поле при повышении рН. Значения pK_a рассчитаны по рН-зависимости для сигналов с максимальными $\Delta\delta$ при данном pK_a .

^{2*} Возможное изменение химического сдвига не обнаружено из-за сильного перекрывания сигналов.

^{3*} Значение $\Delta\delta$ вычислено при 50° C.

б) карбоксильная группа Glu⁷ сближена с α -аминогруппой Cys¹,

в) группы $C^\alpha H_2$ остатков Arg¹³ и Arg¹⁴, $C^\alpha H_3$ остатка Leu¹⁰ и $C^\beta H_3$ остатка Ala⁹ не имеют контактов с ионогенными группами, титрующимися в исследованном диапазоне рН 1,3–12,5.

Значение pK_a имидазольной группы His¹³ найдено из кривых титрования сигналов C2-Н и C4-Н имидазольного кольца при изучении рН-титрования сигналов низкопольной области спектра в H_2O (рис. 8). Сигналы от протонов NH хорошо разрешены (рис. 4a), что позволяет с помощью двойного резонанса однозначно связать их с соответствующими протонами $C^\alpha H$ и в большинстве случаев отнести к индивидуальным аминокислотным остаткам. В рассмотренном диапазоне рН (при более щелочных запечатиях рН увеличение скорости обмена протонов NH с растворителем

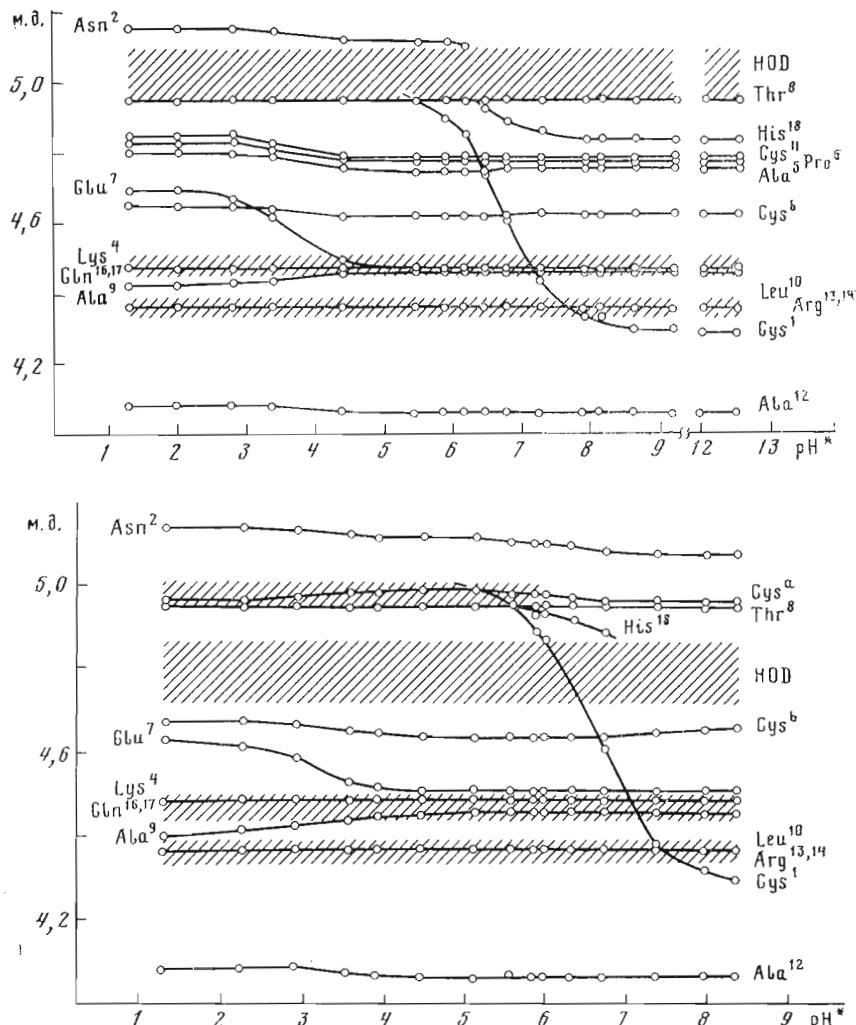


Рис. 7. pH*-Зависимость химических сдвигов протонов С²Н апамина при 32 (а) и 50°С (б) (10 мМ, D₂O)

приводит к уширению и исчезновению сигналов) степень протонирования изменяют α -аминогруппа Cys¹, карбоксильная группа Glu⁷ и имидазольная группа His¹⁸. По pH-зависимости сигналов C²-Н и C⁴-Н имидазольного кольца найдено р K_a 6,6 для His¹⁸. Это значение р K_a , а также величины $\Delta\delta$ (табл. 3) лежат в пределах значений, полученных в модельных соединениях [19, 22]. Кроме этих сигналов значительные изменения химических сдвигов в данном диапазоне pH наблюдаются для сигналов от протонов NH остатков Asn² и Glu⁷. Эти протоны NH изменяют свои химические сдвиги как с р K_a 3,6, так и с р K_a в районе pH 6–7. Ранее на этом основании было сделано предположение о пространственной сближенности α -аминогруппы Cys¹ и карбоксильной группы Glu⁷. Это предположение было подтверждено при наблюдении за pH-зависимостью сигналов NH остатков Asn² и Glu⁷ в полностью ацетилированном апамине ([Ac-Cys¹, Lys(Ac)⁴]апамин) [10] и хорошо согласуется с данными, полученными в этой работе при изучении pH*-зависимости сигналов C²H₂ остатка Glu⁷ и C³H₂ остатка Cys¹.

В области значений pH 6–7 многие сигналы C²Н и NH (рис. 7а, б и 8, табл. 3) испытывают влияние титрования ионогенной группы. Как было

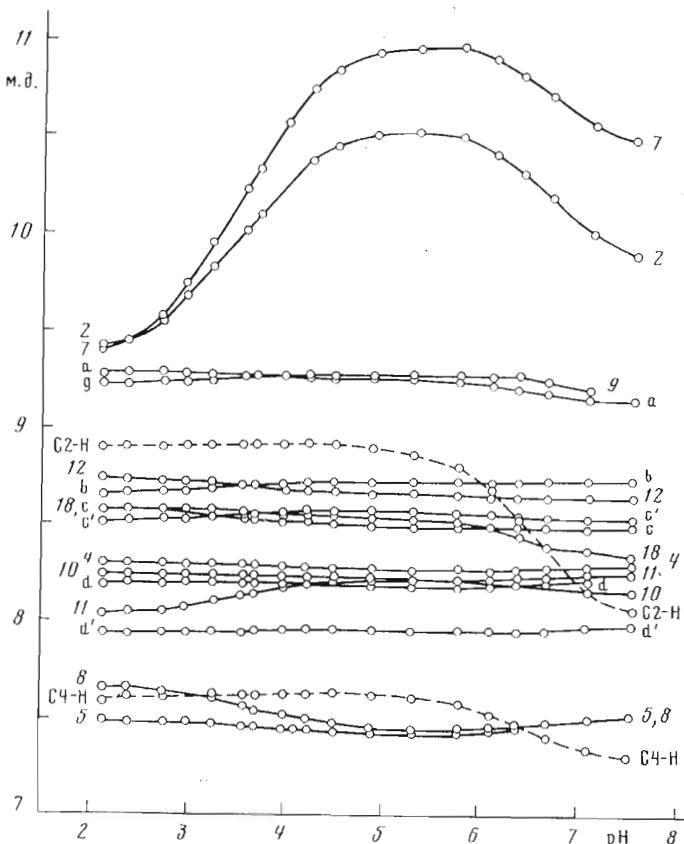


Рис. 8. pH-Зависимость химических сдвигов протонов NH и ароматических протонов C2-H и C4-H остатка His¹⁸ апамина (10 мМ, H₂O, 26°C) [10]. Номера отвечают положению соответствующего аминокислотного остатка в первичной структуре апамина

показано выше, молекула апамина содержит две ионогенные группы с близкими значениями pK_a : α -аминогруппы Cys¹ (pK_a 6,7) и имидазольная группа His¹⁸ (pK_a 6,6). Незначительное различие в значениях pK_a этих двух ионогенных групп требует очень высокой, не всегда достижимой точности эксперимента (особенно при небольших изменениях химических сдвигов) для определения, какие из сигналов испытывают влияние изменения ионизационного состояния His¹⁸, а какие — Cys¹. Для выяснения этого вопроса нами было изучено pH-титрование протонных сигналов ацетилированного по α -аминогруппе аналога апамина.

pH-Зависимость химических сдвигов для [Ac-Cys¹]апамина

На рис. 9 представлены pH-зависимости для сигналов в высокопольной области спектра этого аналога апамина (изменения химических сдвигов протонов при титровании [Ac-Cys¹]апамина приведены в табл. 4). Значение pK_a 4,2 карбоксильной группы Glu⁷, вычисленное по зависимости для сигнала C'Н₂ остатка Glu⁷, является нормальным для остатков глутаминовой кислоты [19]. Повышение pK_a Glu⁷ (для нативного апамина pK_a 3,6) обусловлено отсутствием положительного заряда аминогруппы Cys¹ в α -аминоацетилированном аналоге апамина. По этой же причине в [Ac-Cys¹]апамине до нормальной величины 0,23 м.д. [19] возросло значение $\Delta\delta$ для сигнала C'Н₂ остатка Glu⁷ (табл. 4).

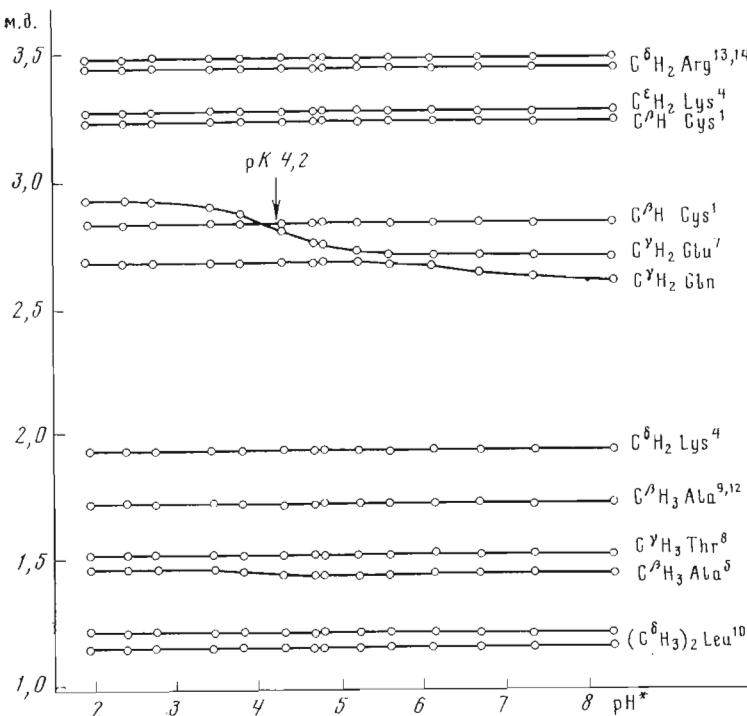


Рис. 9. pH*-Зависимость химических сдвигов протонных сигналов в высокопольной области спектра [Ac-Cys¹]апамина (10 мМ, D₂O, 32° С)

В этом аналоге в области значений pH 6–7 остается только одна ионо-генная группа — имидазольная группа His¹⁸, поэтому можно считать, что группа C¹H₂ остатка Gln¹⁶ или Gln¹⁷, которая изменяет свой химический сдвиг в области pH* 6–7, пространственно сближена с имидазольным кольцом His¹⁸. Из аланиновых метильных групп в отличие от апамина (см. рис. 6) только сигнал CH₃-группы Ala⁵ незначительно смещается при титровании Glu⁷.

В C²H-области спектра ¹H-ЯМР α -аминоацетилированного апамина в диапазоне pH* 6–7 кроме сигнала C²H остатка His¹⁸ титрование имидазольного кольца незначительно изменяет только химический сдвиг C²H остатка Cys^b ($\Delta\delta = -0.01$ м.д.) (рис. 10a). Это указывает на то, что сигналы C²H остатков Asn², Cys^a, Ala⁵ в апамине (рис. 7a и б) изменяют свои химические сдвиги под влиянием изменения ионизационного состояния α -аминогруппы Cys¹. Кроме того, в α -аминоацетилированном апамине в отличие от нативного титрование карбоксильной группы Glu⁷ не влияет на химические сдвиги сигналов C²H остатков Asn², Cys^b, Ala¹² и, наоборот, влияет на химический сдвиг сигнала C²H остатка Thr⁸ (ср. рис. 7a, б и 10a, б).

Следует обратить особое внимание на химические сдвиги сигналов, которые в апамине реагировали как на pK_a карбоксильной группы Glu⁷, так и на pK_a α -аминогруппы Cys¹. В [Ac-Cys¹]апамине часть из них перестает зависеть от pH среды. Согласно спектрам КД [7], а также на основании химических сдвигов сигналов в спектре ЯМР конформация молекулы [Ac-Cys¹]апамина не имеет существенных отличий от конформации апамина. Следовательно, в апамине передача эффекта карбоксильной группы осуществляется через α -аминогруппу, тогда как в N-ацетилированном апамине перенос этого влияния нарушается из-за модификации N-концевого остатка. Можно полагать, что в апамине сигналы от протонов, приближенных к α -аминогруппе, изменяют свои химические сдвиги с pK_a 3,6 не под

Таблица 4

Изменения химических сдвигов протонов при титровании и значения
р K_a [Ac-Cys¹]апамина ^{1*}

Остаток	NH		$^3J_{\text{HN}-\text{C}^\alpha\text{H}}$, Гц	C $^\alpha$ H		Другие протоны	
	$\Delta\delta$, м.д. (26° С)	p K_a		$\Delta\delta$, м.д. (32° С)	p K_a	$\Delta\delta$, м.д. (32° С)	p K_a
Cys ¹	0,12	4,2	7,4	-0,09	4,2	C $^\beta$	Нет изменения
Asn ²	-0,70	4,2	9,5	Нет изменения			
Lys ⁴	0,05	4,2	7,6	2*			
Ala ⁵	0,07	4,2	6,8	0,01	4,2	C $^\beta$	0,02
Pro ⁶				0,01	4,2		
Glu ⁷	-0,85	4,2	7,1	0,16	4,2	C $^\gamma$	0,22
Thr ⁸	0,17	4,2	8,7	-0,02	4,2	C $^\gamma$	Нет изменения
Ala ⁹	Нет изменения		2,7	-0,02	4,2	C $^\beta$	То же
Leu ¹⁰	То же		5,5	2*		C $^\delta$	»
Cys ¹¹	-0,09	4,2	5,9	0,01	4,2		
Ala ¹²	0,04	4,2	2,8	Нет изменения	C $^\beta$		»
His ¹³	0,04	4,2	7,6	2*		C2	0,95
				0,11	6,6	C4	0,34
Cys ^{3, 15}	a	0,09	4,2	5,4	Нет изменения ^{3*}		
	b	-0,03	4,2	5,6	-0,01	6,6	
Arg ^{13, 14}	c	0,02	4,2	3,5	2*	C $^\delta$	Нет изменения
	c'	-0,03	4,2	4,2	2*		То же
Gln ^{15, 16}	d	Нет изменения		6,8	2*	C $^\gamma$	0,07
	d'	То же		6,6	2*	C $^\gamma$	Нет изменения

1*, 2*, 3* См. примечания к табл. 3.

влиянием непосредственно ионизации карбоксильной группы, а в результате изменения электрического дипольного момента N⁺-концевого остатка, происходящего из-за депротонирования карбоксильной группы.

В апамине влияние ионизации карбоксильной группы на C $^\alpha$ H остатка Cys¹ мы не наблюдали, по-видимому, в связи с перекрыванием сигналов (табл. 3). Интересно, что в [Ac-Cys¹]апамине сигнала C $^\alpha$ H-протона Cys¹ изменяет свой химический сдвиг с р K_a 4,2 (рис. 10a и б). Это свидетельствует о том, что в ацетилированном аналоге апамина обнаруженная пространственная сближенность карбоксильной группы Glu⁷ и α -аминогруппы Cys¹ сохраняется. Как и в самом апамине, в [Ac-Cys¹]апамине наблюдается pH-зависимость сигнала C $^\alpha$ H остатка Glu⁷ с аномально большим $\Delta\delta$ 0,16 м.д. (табл. 4), которое уменьшается до $\Delta\delta$ 0,14 м.д. при повышении температуры до 50° С.

Существенные изменения в поведении сигналов при pH-титровании произошли в области сигналов NH (рис. 11). Ни один из сигналов NH не испытывает влияния титрования имидазольной группы His¹⁸ (единственным исключением может быть NH остатка His¹⁸, однако при значениях pH > 6 он уширяется и исчезает из-за быстрого обмена с растворителем). Сигналы NH остатков Asn² и Glu⁷, которые испытывали значительные химические сдвиги с р K_a 3,6 и 6,7 в апамине (рис. 8), в α -аминоацетилированном апамине меняют свои химические сдвиги только с р K_a 4,2, соответствующем титрованию карбоксильной группы Glu⁷ (рис. 11). Значения р K_a и $\Delta\delta$ для His¹⁸ (табл. 4), вычисленные для сигналов C2-H и C4-H α -аминоацетилированного апамина, остаются такими же, как для апамина. Влияние изменения ионизационного состояния имидазольного кольца His¹⁸ только на химические сдвиги сигналов C $^\alpha$ H₂ одного из глутаминов и C $^\alpha$ H остатка Cys^b свидетельствует о его пространственной сближенности с

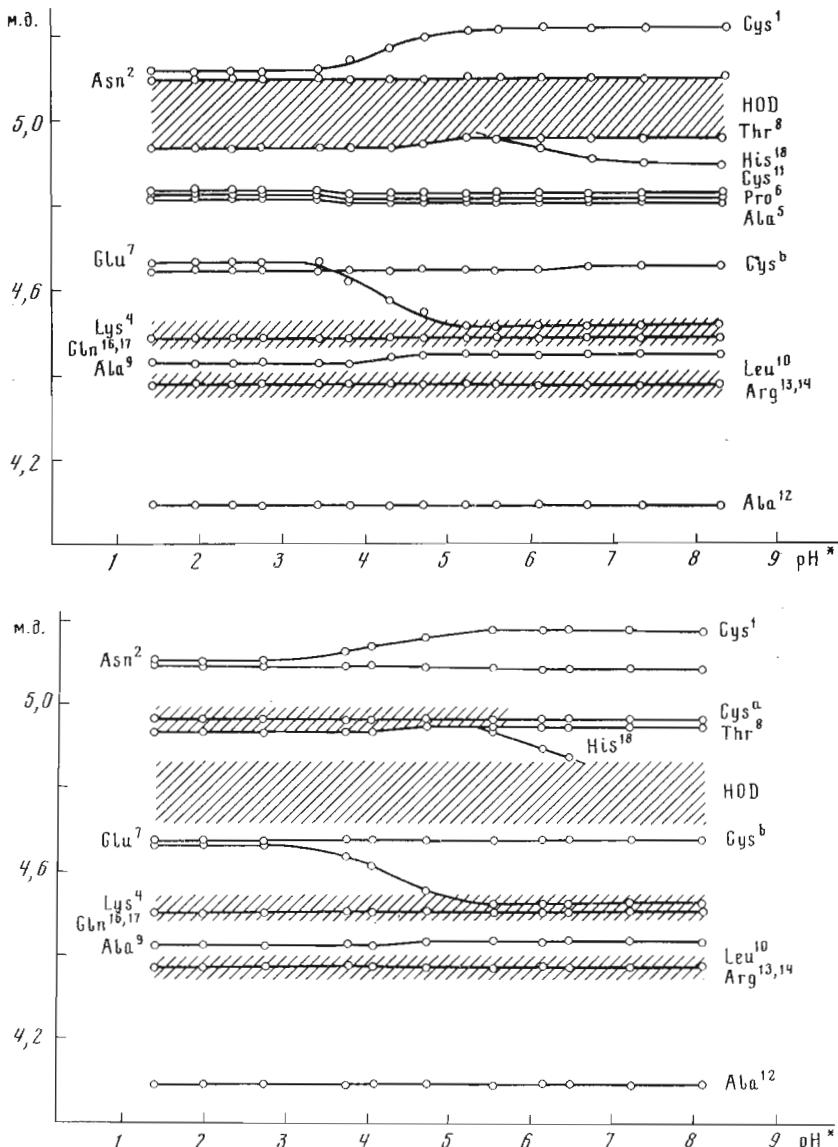


Рис. 10. pH*-Зависимость химических сдвигов протонов C^αH [Ac-Cys¹]-аламина при 32° (а) и 50° С (б) (10 мМ, D_2O)

этими остатками и об удаленности His¹⁸ от бициклической части молекулы и боковых цепей других аминокислотных остатков.

Таким образом, сравнение pH-зависимости сигналов аламина и α -аминоацетилированного аналога указывает на то, что в большинстве случаев изменения химических сдвигов сигналов аламина в области pH 6–7 обусловлены изменением ионизационного состояния α -аминогруппы Cys¹.

Смещение сигналов полипептидов при ионизации ионогенных групп может быть следствием ряда эффектов: передачи изменения электронной плотности по химическим связям, возмущающего влияния электростатического поля зарядов и локальных конформационных перестроек [9]. Первый эффект действует в пределах соседних 1–2 аминокислотных остатков и приводит к смещению сигналов в сильное поле (уменьшение значений химических сдвигов) при депротонировании [19]. Два других эффекта мо-

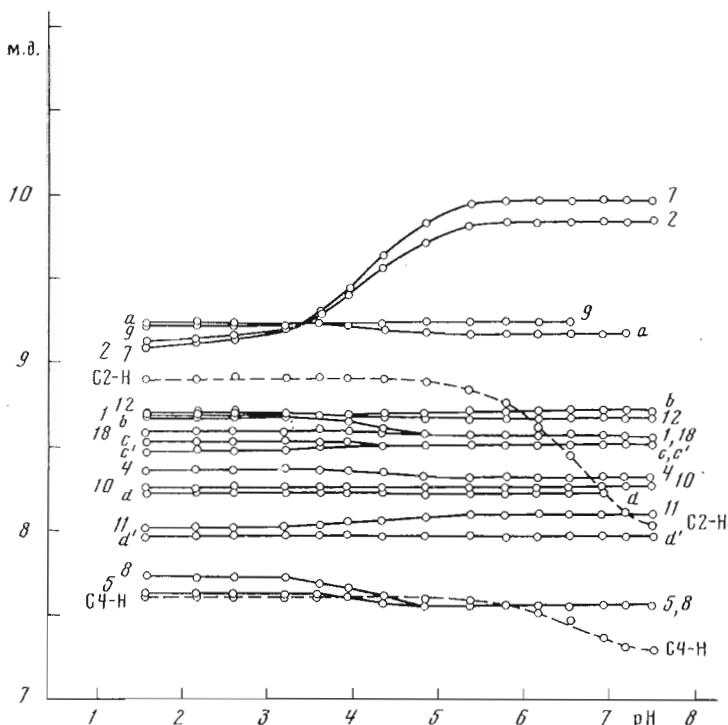


Рис. 11. pH-Зависимость химических сдвигов протонов NH и ароматических протонов C2-H и C4-H остатка His¹⁸ [Ac-Cys¹]апамина (10 мМ, H₂O, 26°С). Помера отвечают положению соответствующего аминокислотного остатка в первичной структуре молекулы

гут затрагивать аминокислотные остатки, удаленные по полипептидной цепи, но пространственно сближенные вследствие особенности конформационного строения молекулы. Эти пространственные эффекты могут вызывать как увеличение, так и уменьшение химических сдвигов.

Таким образом, увеличение химических сдвигов сигналов протонов прямо указывает на наличие пространственных эффектов, обусловленных либо конформационными изменениями в структуре молекулы, либо эффектами электростатического влияния через пространство.

С этой точки зрения представляет интерес обнаруженный контакт карбоксильной группы Glu⁷ и α -аминогруппы Cys¹. Сигналы C^aH и NH нативного апамина хорошо разрешены (рис. 4а и б), что позволяет анализировать даже слабые влияния ионогенных групп на химические сдвиги сигналов от индивидуальных остатков. Из результатов титрования аналогичных сигналов в α -аминоацетилированном апамине следует, что титрование карбоксильной группы Glu⁷ и α -аминогруппы Cys¹ влияет на химические сдвиги сигналов практически всех аминокислотных остатков (табл. 3 и 4). Это прямо указывает на то, что большая часть изменений химических сдвигов сигналов обусловлена влиянием депротонирования ионогенных групп через пространство. Действительно, в молекуле апамина значительная часть протонных сигналов увеличивает свой химический сдвиг в процессе депротонирования обеих ионогенных групп. Наибольший химический сдвиг в слабое поле испытывают сигналы NH остатков Glu⁷ и Asn² при депротонировании карбоксильной группы (рис. 8). Какова же природа этих химических сдвигов?

Можно предположить, что при депротонировании карбоксильной группы Glu⁷ возникает зарядовое взаимодействие ее с положительно заряженной α -аминогруппой Cys¹. Такое взаимодействие действительно могло бы

вызывать существенные конформационные перестройки молекулы, которые привели бы к наблюдаемым химическим сдвигам. Однако известно, что конформация молекулы апамина в целом не претерпевает существенных изменений в широком диапазоне значений pH [7]. Кроме того, хотя в [Ac-Cys¹]апамине N-концевой положительный заряд отсутствует, при титровании карбоксильной группы происходят те же изменения химических сдвигов протонов NH большинства аминокислотных остатков (рис. 11), что и для апамина (рис. 8). Показательно также, что сигналы NH остатков Asn² и Glu⁷ по-прежнему смещаются в сторону слабого поля при титровании Glu⁷ с большими значениями $\Delta\delta$. Обращает на себя внимание и то, что амидный протон Cys¹ в α -аминоацетилированном апамине (рис. 11) изменяет свой химический сдвиг на значительно меньшую величину, чем сигнал NH остатка Asn². Перечисленные факты указывают на то, что, несмотря на отсутствие N-концевого положительного заряда, в ацетилированном по α -аминогруппе апамине при ионизации карбоксильной группы происходят небольшие структурные перестройки боковых цепей молекулы, вызывающие изменения химических сдвигов протонов NH большинства аминокислотных остатков.

На модельных пептидах, содержащих остаток глутаминовой кислоты, показана возможность образования водородной связи депротонированной карбоксильной группы глутаминовой кислоты с водородами NH основной цепи [19], и в частности с собственной группой NH. При этом сигналы NH-протонов смещались в область более слабого магнитного поля из-за сильной поляризации связи N—H.

На основании этих данных нам представляется наиболее вероятным, что в апамине при депротонировании карбоксильной группы Glu⁷ образуются водородные связи с пептидными группами NH остатков Glu⁷ и Asn². Это приводит к структурным изменениям, которые распространяются на значительную область молекулы, влияя на химические сдвиги протонов аминокислотных остатков, пространственно удаленных от Glu⁷.

На основании величин $\Delta\delta$ протонов NH в линейных пептидах рассчитано содержание молекул, участвующих в подобных водородных связях, исходя из независимости этих величин от геометрии связывания [19]. Однако в случае N-ацетилированного апамила (который выбран для сравнения из-за отсутствия в нем соседнего положительного заряда) величины $\Delta\delta$ для амидных протонов как остатка Glu⁷, так и Asn² (табл. 4) превышают примерно в 2 раза $\Delta\delta$ протона NH, принятого за 100% водородно связанный. Геометрическими особенностями водородных связей, которые образует депротонированная карбоксильная группа в апамиле и продуктах его химической модификации, по-видимому, объясняются и аномально большие $\Delta\delta$ для сигнала протона C^aH, которые уменьшаются при повышении температуры, т. е. при ослаблении водородных связей.

Таким образом, на основании изучения ацетилированного по α -аминогруппе апамина в дополнение к структурным заключениям, полученным на нативном апамиле, можно сделать следующие выводы:

а) вследствие пространственной близости двух ионогенных групп (карбоксильная группа Glu⁷ и α -аминогруппа Cys¹) влияние депротонирования одной из них передается через другую на значительные расстояния посредством либо электростатических взаимодействий, либо слабых конформационных возмущений. Кроме того, при депротонировании карбоксильной группы происходит образование системы водородных связей, в которых участвуют карбоксильная группа Glu⁷ и группы NH остатков Asn² и Glu⁷. Совокупность этих эффектов приводит к тому, что депротонирование обеих групп сказывается на химических сдвигах сигналов протонов практически всех аминокислотных остатков. При этом конформация молекулы в целом заметных изменений не претерпевает;

б) имидазольное кольцо His¹⁸ удалено от основной глобулы молекулы и поэтому не влияет на химические сдвиги протонов большинства амино-

кислотных остатков. Исключениями являются протон С^αН остатка Сys^β и протоны боковой цепи одного из глутамиловых остатков, которые меняют свои химические сдвиги при депротонировании имидазольного кольца.

pH-Зависимость химических сдвигов для [Orn(Pyr)¹³, Orn(Pyr)¹⁴]апамина

При изучении поведения сигналов протонов апамина при pH-титровании не было возможности наблюдать влияние депротонирования гуанидиновых групп Arg¹³ и Arg¹⁴ из-за высоких значений рК этих групп. Данные по химической модификации показывают, что биологическая активность молекулы апамина значительно изменяется только при модификации гуанидиновых групп Arg¹³ и Arg¹⁴ [7, 23]. В связи с этим представляет большой интерес определить взаимную ориентацию боковых цепей соседних аргининовых остатков, а также положение их относительно всей структуры молекулы. Для этого были изучены спектры ¹Н-ЯМР апамина, модифицированного по боковой цепи Arg¹³ и Arg¹⁴. С помощью химической модификации эти остатки были превращены в N^ε-пиримидилорнитины. При этом пространственная структура [Orn(Pyr)¹³, Orn(Pyr)¹⁴]апамина, согласно спектрам КД, остается практически идентичной структуре апамина [7].

Такая модификация боковых цепей аргининовых остатков удобна по нескольким причинам. Во-первых, наличие π-сопряженных систем в боковых цепях аминокислотных остатков позволяет обнаруживать неналентные контакты, которые проявляются за счет влияния магнитной анизотропии колыцевых токов. Это особенно важно в случае апамина, который содержит соседние аргининовые остатки. Ориентация боковых цепей этих остатков, по-видимому, играет особую роль в биологической активности молекулы [25]. Во-вторых, если в пативном апамине во всем исследованном диапазоне значений pH (1–12,5) гуанидиновые группы положительно заряжены, то при данной модификации в большей части диапазона pH они электронейтральны. Это позволяет судить о влиянии положительного заряда гуанидиновых групп на остальные ионогенные группы апамина. В-третьих, так как имингруппа пиридинового кольца ионизуется с рK_a~3, возникает возможность наблюдать влияние этой ионизации на соседние группировки, т. е. выявить возможные неналентные контакты боковых цепей аргининовых остатков с пространственно сближенными группами. Формально в результате проведенной химической модификации мы как бы попозирили значения рK боковых цепей аргининовых остатков и получили возможность наблюдать влияние их депротонирования на структуру молекулы апамина.

Расчет значений рK_a кривых титрования сигналов в низкопольной области спектра ¹Н-ЯМР модифицированного апамина (рис. 12) показал, что рK_a 6,6 гистидинового остатка не изменяется при модификации. Кроме сигналов от протонов C2-Н и C4-Н имидазольного кольца His¹⁸ в спектре наблюдаются сигналы от ароматических протонов двух пиридининовых колец. Ионизация обоих пиридининовых колец происходит с одинаковыми значениями рK_a 3,8. Одинаковые значения рK_a и примерно одинаковые химические сдвиги ароматических сигналов указывают на сходность микроокружения боковых цепей обоих орнитиновых остатков. Сравнение химических сдвигов ароматических сигналов с аналогичными сигналами модельного соединения (N^ε-пиримидилорнитина) свидетельствует о достаточно высокой степени контакта боковых цепей [Orn(Pyr)¹³, Orn(Pyr)¹⁴]-апамина со средой.

На отсутствие взаимодействия между π-электронными системами двух пиридининовых колец указывает как отсутствие изменений химических сдвигов ароматических сигналов при изменении температуры (рис. 12), так и значения коэффициентов Хилла (*h*=0,95), полученные при матема-

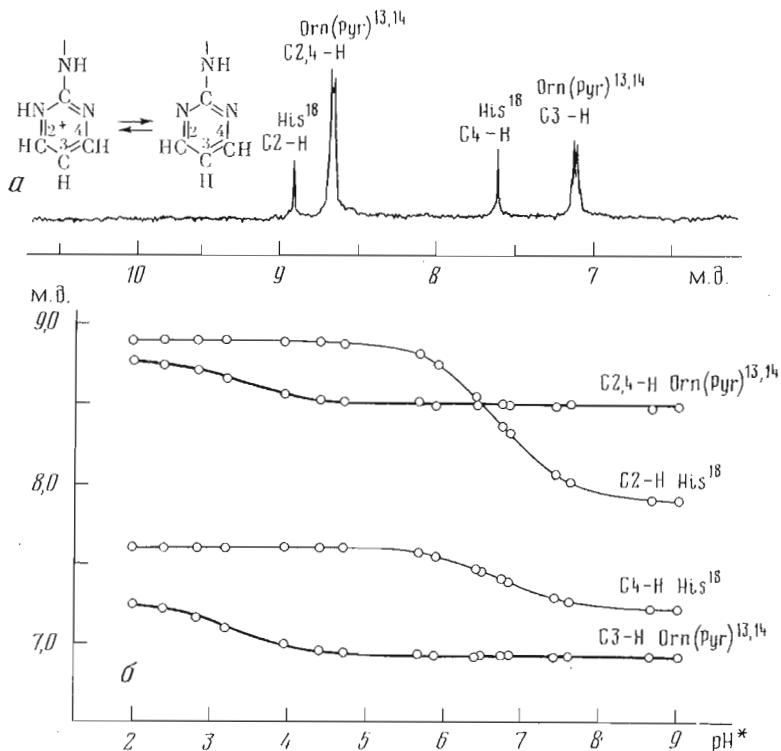


Рис. 12. Низкопольная область ¹Н-ЯМР-спектра [Orn(Pyr)¹³, Orn(Pyr)¹⁴]-апамина; *а* – ароматические сигналы [Orn(Pyr)¹³, Orn(Pyr)¹⁴]апамина (рН* 3,2; 5 мМ, 32° С, D₂O), *б* – рН*-зависимость их химических сдвигов

тической обработке кривых рН-титрования протонных сигналов обоих пиримидиновых колец.

Сравнение кривых титрования протонных сигналов [Orn(Pyr)¹³, Orn(Pyr)¹⁴]апамина в области C^αH (рис. 13) с рН*-зависимостями сигналов в C^αH-области нативного апамина (рис. 7а и б, табл. 3) показало, что основная часть сигналов в обоих образцах имеет близкие химические сдвиги и испытывает влияние ионогенных групп с аналогичными значениями рK_a и Δδ (табл. 5). Только два сигнала с химическими сдвигами 4,76 и 4,32 м.д. (рН 2,0, рис. 13а) существенно отличаются от наблюдавшихся в апамине и испытывают влияние изменения ионизационного состояния пиримидинового кольца (или колец) с рK_a~3,3. Отнесение их к индивидуальным остаткам получено при сопоставлении с сигналами высокопольной области спектра.

Поведение при рН-титровании и химические сдвиги сигналов C⁶H₂ и C⁸H₂ остатка Lys⁴, C⁹H₂ Cys¹, C¹⁰H₂ Glu⁷, C¹¹H₂ одного из Gln, C⁹H₃, Ala^{5,12} и C¹⁰H₃ Thr⁸ в высокопольной области спектра [Orn(Pyr)¹³, Orn(Pyr)¹⁴]-апамина (рис. 14) не меняются по сравнению с соответствующими сигналами апамина в исследованном диапазоне значений рН*. Сигналы C⁶H₂ остатков Orn(Pyr)¹³ и Orn(Pyr)¹⁴ титруются со значениями рK_a 3,3, соответствующими ионизации пиримидиновых колец. Существенное влияние дегидратации пиримидинового кольца испытывают сигналы C⁶H₃ остатка Leu¹⁰. Это указывает на сближенность боковой цепи одного из орнитиновых остатков с боковой цепью Leu¹⁰. Влияние анизотронии пиримидинового кольца приводит к увеличению экранирования протонов C⁶H₃, что свидетельствует о расположении метильных групп над (или под) плоскостью пиримидинового кольца. Эксперименты по гомоядерному мультичастотному резонансу показали, что сигналы C^αH-области (рис. 13а)

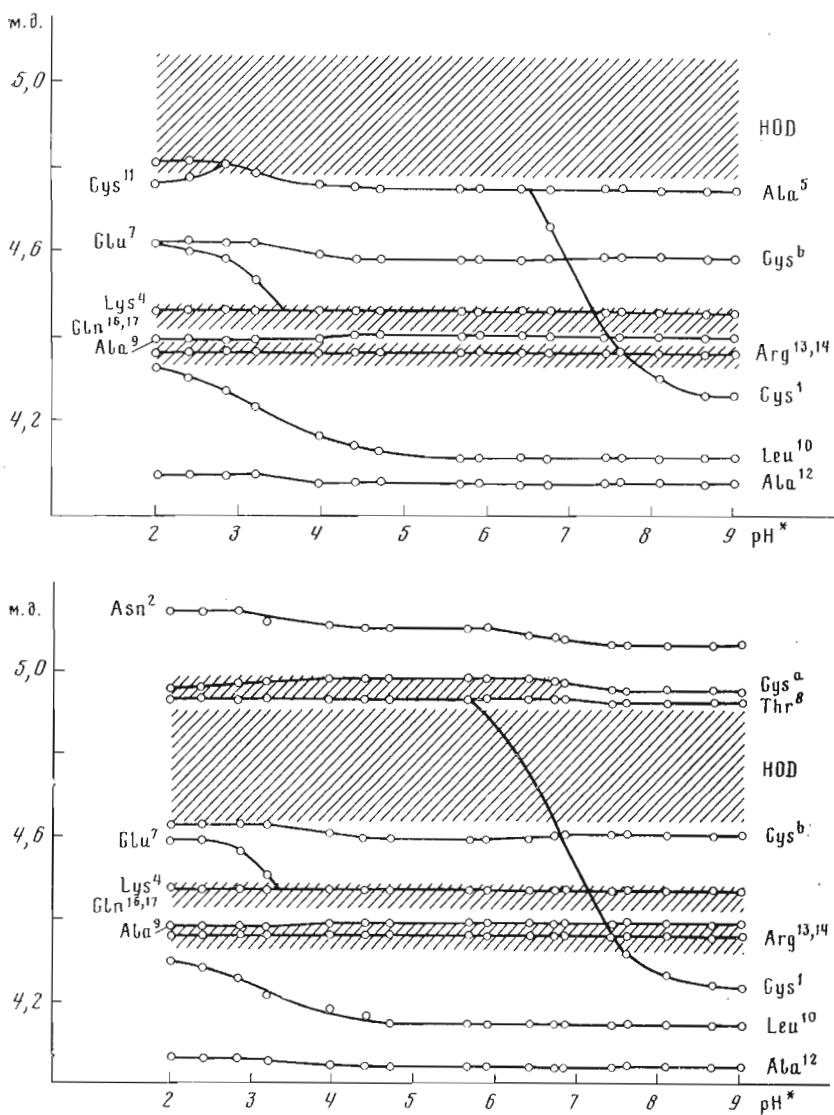


Рис. 13. рН*-Зависимость химических сдвигов протонов $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ [$\text{Orn}(\text{Pyr})^{13}$, $\text{Orn}(\text{Pyr})^{14}$]-апамила при 32°C (a) и 50°C (b) (5 mM , D_2O)

с химическими сдвигами 4,76 и 4,32 м.д. соответственно относятся к $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ -протонам Cys^{11} и Leu^{10} . Судя по изменению химического сдвига и поведения сигнала $\text{C}^{\beta}\text{H}_3$ остатка Ala^9 при рН-титровании по сравнению с данными для аламина, этот остаток также испытывает влияние анионом и изменения ионизационного состояния пиримидинового кольца. Эти результаты подтверждают вывод о сближенности боковой цепи одного из орнитиновых остатков с боковой цепью Leu^{10} , что сказывается и на соседних аминокислотных остатках Ala^9 и Cys^{11} . Анализ химических сдвигов остальных сигналов протонного спектра аламина, модифицированного по аргининовым остаткам, свидетельствует об удаленности боковой цепи второго орнитинового остатка от других аминокислотных остатков.

Сравнение результатов рН*-титрования протонных сигналов спектра аламина (рис. 6 и 7, табл. 3) и [$\text{Orn}(\text{Pyr})^{13}$, $\text{Orn}(\text{Pyr})^{14}$]апамина (рис. 13 и 14, табл. 5) показывает, что значения pK_a ионогенных групп и большинство химических сдвигов одинаковы в обоих образцах. Исключение со-

Таблица 5

Изменение химических сдвигов протонов при титровании и значения
 pK_a [Orn(Pyr)¹³, Orn(Pyr)¹⁴]апамина ^{1*}

Остак- ток	$C^\alpha H$		Другие протоны		Остаток	$C^\alpha H$		Другие протоны		
	$\Delta\delta$, м. д. (32° С)	pK_a	$\Delta\delta$, м. д. (32° С)	pK_a		$\Delta\delta$, м. д. (32° С)	pK_a	$\Delta\delta$, м. д. (32° С)	pK_a	
Cys ¹	2*	3,6	C^β	2*	3,6	Ala ¹²	0,02	3,6	C^β	-0,02
	0,78	6,7		0,41	6,7					0,02
			C^β'	0,02	3,6	His ¹⁸	2*	6,6	C_2	0,99
Asn ²	0,04 ^{3*}	3,6							C_4	0,37
	0,04 ^{3*}	6,7				Cys ^{3, 15}	^a	-0,02 ^{3*}	3,6	
Lys ⁴	2*							0,03 ^{3*}	6,7	
Ala ⁵	0,06	3,6	C^β	0,03	3,6			^b	0,04	3,6
Pro ⁶	2*	3,6				Arg ^{13, 14}	^c	2*		
Glu ⁷	0,25	3,6	C^γ	0,14	3,6				$C_{2,4}$	0,29
	2*	6,7		0,04	6,7				C_3	0,33
Thr ⁸	0,01 ^{3*}	6,7	C^γ	0,04	3,6		^{c'}	2*	C^δ	0,24
Ala ⁹	-0,01	3,6	C^β	-0,02	3,3				$C_{2,4}$	0,28
Leu ¹⁰	0,21	3,3	C^δ	0,05	3,3	Gln ^{15, 16}	^d	2*	C_3	0,35
Cys ¹¹	-0,16	3,3					^{d'}	2*	C^δ	0,15
	2*	3,6	C^δ'	0,11	3,3				C^γ	0,08
									C^γ	6,6
										Нет измене- ния

^{1*}, ^{2*}, ^{3*} См. примечания к табл. 3.

ставляют сигналы протонных атомов, находящихся поблизости от контактирующих боковых цепей Leu¹⁰ и одного из N^ε-пиримидилорнитинов. Это указывает на идентичность пространственных структур апамина и его модифицированного аналога, которая была обнаружена ранее по спектрам КД [7] и позволяет использовать полученные данные о невалентных контактах в [Orn(Pyr)¹³, Orn(Pyr)¹⁴]апамине для описания пространственной структуры апамина.

В дополнение к данным о пространственной структуре молекулы, полученным при изучении апамина и [Ac-Cys¹]апамина, исследование спектров ¹Н-ЯМР [Orn(Pyr)¹³, Orn(Pyr)¹⁴]апамина позволило получить следующие результаты:

а) гуанидиновые группы Arg¹³ и Arg¹⁴ удалены друг от друга и не имеют пространственных контактов с другими ионогенными группами молекулы;

б) боковая цепь одного из аргининовых остатков сближена с боковой цепью Leu¹⁰, тогда как боковая цепь другого не имеет пространственных контактов.

Пространственное строение апамина

Таким образом, в результате изучения рН-зависимостей химических сдвигов протонных сигналов апамина и двух продуктов его селективной химической модификации получена информация о невалентных контактах между боковыми цепями аминокислотных остатков, удаленных друг от друга по аминокислотной последовательности. На рис. 1б схематически представлена пространственная структура молекулы апамина, на которой показаны обнаруженные взаимные расположения боковых цепей ряда аминокислотных остатков. На основании данных ¹Н-ЯМР пока не удалось локализовать остаток глутамина, сближенный с имидазольным кольцом His¹⁸. Это обусловлено тем, что, хотя поведение сигналов C¹H₂ остатков Gln¹⁶ и Gln¹⁷ при рН-титровании различно, химические сдвиги сигналов

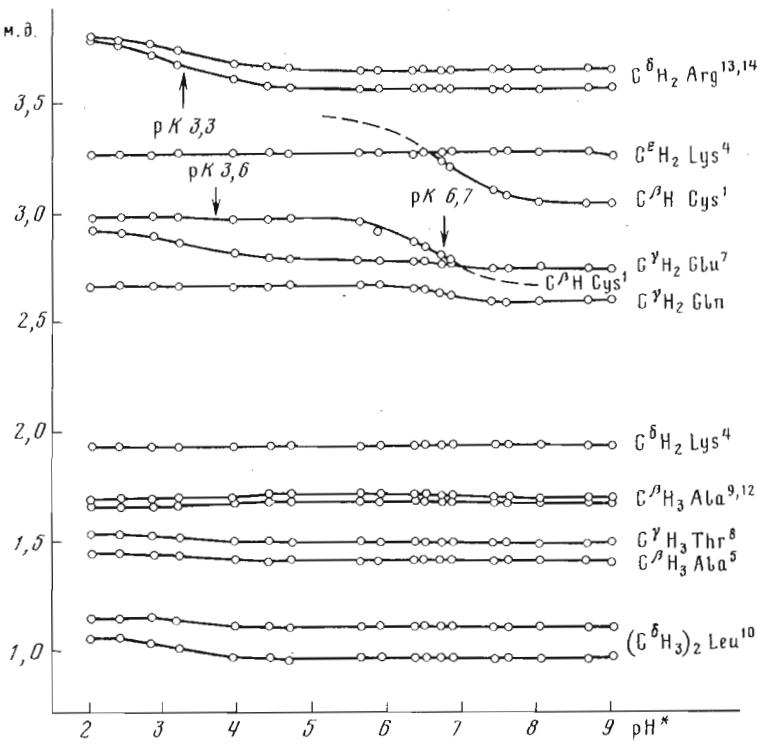


Рис. 14. pH*-Зависимость химических сдвигов протонных сигналов в высокопольной области спектра $[Orn(Pyr)^{13}, Orn(Pyr)^{14}]$ апамина (5 мМ, D_2O , $32^\circ C$)

протонов $C^{\beta}H_2$ и $C^{\gamma}H$ этих остатков совпадают. Не известно также, какому из аргининовых остатков принадлежит боковая цепь, сближенная с Leu^{10} . Боковые цепи Lys^4 и His^{18} , остатков, ионогенные группы которых, согласно данным по химической модификации, не играют существенной роли в проявлении биологической активности [7, 23], удалены от остова молекулы. Пространственная сближенность боковой цепи Glu^7 и α -аминогруппы Cys^1 приводит к частичной компенсации их зарядов. Хотя биологическая активность апамина, модифицированного по α -аминогруппе Cys^1 или карбоксильной группе Glu^7 , слабо уменьшается по сравнению с нативным апамином [7], компенсация положительного заряда, видимо, необходима в процессе функционирования молекулы. Это подтверждается существованием природного аналога апамина (апамина-2), в котором N-концевой аминокислотный остаток блокирован [7]. Токсичность апамина-2 совпадает с токсичностью апамина-1.

Как было показано выше, сближенность боковой цепи Glu^7 с N-концевым участком молекулы приводит при депротонировании карбоксильной группы к образованию системы водородных связей, в которой кроме карбоксильной группы участвует несколько пептидных групп NH. Образование этих водородных связей, а также пространственная сближенность двух разноименных зарядов α -аминогруппы Cys^1 и карбоксильной группы Glu^7 вызывают при депротонировании этих групп изменение химических сдвигов протонных сигналов аминокислотных остатков, удаленных по первичной структуре (рис. 6–8, табл. 3). Протоны NH, значительно изменяющие свои химические сдвиги при ионизации как карбоксильной группы, так и α -аминогруппы, выделены на рис. 15. Изменения химических сдвигов этих сигналов обусловлены, по-видимому, тем, что протоны NH наиболее чувствительны к образованию и разрыву водородных связей. Сближенность

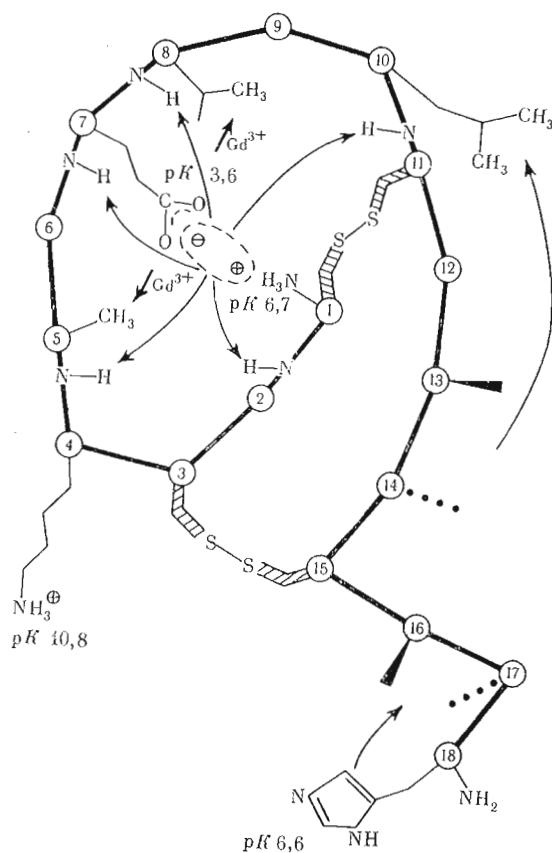


Рис. 15. Схема взаимного расположения групп аминокислотных остатков в апамине, полученная по данным ЯМР-спектроскопии (см. пояснения в тексте)

метильных протонов Ala⁵ и Thr⁸ с карбоксильной группой Glu⁷ была обнаружена ранее при отнесении протонов C¹³H₂ остатка Glu⁷ с помощью парамагнитного зонда Gd(NO₃)₃ [10].

Особый интерес представляет обнаруженное расположение боковых цепей Arg¹³ и Arg¹⁴. Известно, что гуанидиновые группы Arg¹³ и Arg¹⁴ играют доминирующую роль в биологической активности апамина. Одновременная модификация по обеим группам приводит к полной потере активности [7, 23]. Замена любого из остатков аргинина на лизин приводит к незначительному уменьшению активности, а замена обоих — к полной потере активности [24, 25]. Результаты химической модификации аргининовых остатков, а также данные для других аналогов апамина, в которых аргининовые остатки заменены на лизин, орнитин и гомоаргинин, показали, что биологическая активность молекулы зависит не только от наличия положительных зарядов в боковой цепи аминокислотных остатков (в положении 13, 14), но и от длины боковой цепи [25]. Возможно, что обнаруженное нами удаленное расположение гуанидиновых групп соседних аргининовых остатков друг от друга (рис. 15) является определяющим в биологической активности.

Экспериментальная часть

Выделение апамина из яда медоносной пчелы *Apis mellifera*, а также получение его модифицированных аналогов [Ac-Cys¹]апамина и [Orn(Pyr)¹³, Orn(Pyr)¹⁴]апамина описано в работе [7].

Спектры ^1H - и ^{13}C -ЯМР получены на спектрометре SC-300 Varian в импульсном режиме с фурье-преобразованием на ЭВМ типа 620/L-100 Varian (16K), модифицированном для гомо- и гетероядерного многочастотного резонанса [11]. Химические сдвиги протонных сигналов измерены относительно внешнего стандарта гексаметилдисилоксана. Концентрация апамина в растворах H_2O и D_2O (100%, Stohler Isotope) в 5-мм ампуле была в пределах 5–50 мМ в зависимости от типа эксперимента. Параметры спектров не зависят от концентрации. Химические сдвиги протонных сигналов измерены с точностью $\pm 0,01$ м.д., а значения констант спин-спинового взаимодействия — с точностью $\pm 0,1$ Гц. Измерения pH выполнены при 23° С с помощью pH-метра Orion Research 601 с комбинированным электродом Ingold 405 M3 непосредственно в ЯМР-ампуле. Калибровка pH-метра выполнена по двум стандартным буферам с pH 4 и 7 (Ingold). Приведенные значения pH соответствуют показаниям pH-метра. Для растворов в D_2O обозначение pH отвечает некорректированным показаниям pH-метра. Изменения pH проводились добавлением стандартных 0,3 н. растворов NaOD и DCl.

Для определения констант диссоциации и химических сдвигов для форм, участвующих в равновесии, была использована программа итерационной обработки экспериментальных кривых титрования [26], минимизирующая функцию

$$F = \sum_i (\delta_i^{\text{набл}} - \delta_i^{\text{расчет}})^2, \quad (1)$$

где $\delta_i^{\text{набл}}$ — наблюдаемые химические сдвиги, а $\delta_i^{\text{расчет}}$ определялось из уравнения

$$\delta_i^{\text{расчет}} = \delta_{\text{H}^0} + \frac{\delta_{\text{H}^+} - \delta_{\text{H}^0}}{1 + 10^{h(\text{pH}_i - \text{pK})}}, \quad (2)$$

где δ_{H^+} и δ_{H^0} — химические сдвиги протонированного и депротонированного состояний соответственно, $\text{pK}_a = -\lg K_a$, где K_a — константа диссоциации, h — коэффициент Хилла. Уравнение (1) оптимизировалось относительно четырех параметров: δ_{H^0} , δ_{H^+} , pK и h . Во всех случаях, согласно расчету, значение h отличалось от единицы не более чем на 5%.

Особо следует отметить, что значения pK_a , найденные по pH-зависимости различных сигналов, в пределах погрешности опыта совпадали для растворов в H_2O и D_2O , что подтверждает компенсацию изотопных эффектов в данном диапазоне pH [27].

ЛИТЕРАТУРА

- Habermann E. (1972) Science, **177**, 314–322.
- Habermann E., Cheng-Raude D. (1975) Toxicon, **13**, 465–473.
- Cheng-Raude D., Habermann E. (1976) Toxicon, **14**, 467–476.
- Habermann E. (1977) Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol., **300**, 189–191.
- Байдан Л. В., Владимирова И. А., Мирошников А. И., Таран Г. А. (1978) Докл. АН СССР, **241**, 1224–1226.
- Владимирова И. А., Шуба М. Ф. (1978) Нейрофизиология, **10**, 295–299.
- Мирошников А. И., Елякова Е. Г., Куделин А. Б., Сенявина Л. Б. (1978) Биоорганическая химия, **4**, 1022–1028.
- Овчинников Ю. А., Иванов В. Т., Шкроб А. М. (1974) Мембрено-активные комплексы, «Наука», М.
- Wüthrich K. (1976) NMR in Biological Research: Peptides and Proteins, American Elsevier, New York.
- Bystrov V. F., Arseniev A. S., Gavrilov Yu. D. (1978) J. Magn. Res., **30**, 151–184.
- Быстров В. Ф., Оханов В. В., Арсеньев А. С., Афанасьев В. А., Гуревич А. З. (1980) Биоорганическая химия, **6**, 386–392.
- Miroshnikov A. I., Okhanov V. V., Arseniev A. S., Elyakova E. G., Bystrov V. F. (1978) FRG-USSR Symposium on Chemistry of Peptides and Proteins, 126–128, Grainau/Eibsee.
- Bystrov V. F. (1976) Progress in NMR Spectroscopy, **10**, 41–81.

14. Glickson J. D., Cunningham W. D., Marshall G. R. (1973) Biochemistry, **12**, 3684—3692.
15. Markley J. L., Finkenstadt W. R. (1975) Biochemistry, **14**, 3562—3566.
16. Arseniev A. S., Balashova T. A., Utkin Yu. N., Tsetlin V. I., Bystrov V. F., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. (1976) Eur. J. Biochem., **71**, 595—606.
17. Tsetlin V. I., Arseniev A. S., Utkin Yu. N., Gurevich A. Z., Senyavina L. B., Bystrov V. F., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. (1979) Eur. J. Biochem., **94**, 337—346.
18. Rabenstein D. L., Greenberg M. S., Evans C. A. (1977) Biochemistry, **16**, 977—981.
19. Bundi A., Wüthrich K. (1979) Biopolymers, **18**, 285—297, 299—311.
20. Conti F., Pietronero C., Viglino P. (1970) Org. Magn. Resonance, **2**, 131—139.
21. Breslow E. (1961) Biochim. et biophys. acta, **53**, 606—609.
22. Tanokura M., Tasumi M., Miyazawa T. (1976) Biopolymers, **15**, 393—401.
23. Vincent J. P., Schweitz H., Lazdunski M. (1975) Biochemistry, **14**, 2521—2525.
24. Granier C., Muller E. P., van Rietschoten J. (1978) Eur. J. Biochem., **82**, 293—299.
25. Sandberg B. E. B. (1979) Int. J. Peptide Protein Res., **13**, 327—333.
26. Гуревич А. З., Арсеньев А. С., Охапов В. В., Афанасьев В. А. (1977) Тезисы Всесоюзного симпозиума «Магнитный резонанс в биологии и медицине», с. 49, М.
27. Kalinichenko P. (1976) Stud. biophys., **58**, 235—240.

Поступила в редакцию
5.II.1980

SPATIAL STRUCTURE OF APAMIN IN SOLUTION. CONFORMATIONAL NMR ANALYSIS

OKHANOV V. V., AFANAS'EV V. A., GUREVICH A. Z., ELYAKOVA E. G.,
MIROSHNIKOV A. I., BYSTROV V. F., OVCHINNIKOV Yu. A.

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

Most of the signals in the ^1H -NMR spectrum of apamin, a neurotoxin from bee venom, are assigned in accordance with the primary structure of molecule by homo- and heteronuclear $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ multiresonance decoupling. The assignment serves as a firm ground for characterizing the microenvironment of the corresponding molecular fragments by observing the signal parameters under various conditions. The pH-dependence of proton signals is studied in detail for apamin and its modified derivatives — [Ac-Cys 1]apamin and [Orn(Pyr) 13 , Orn(Pyr) 14]apamin. The data obtained provide a number of noncovalent contacts between amino acid residues and reveal the relative position of ionogenic groups. In total, the experimental results allowed to propose a model for the spatial structure of apamin in solution.