БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
том 7 • № 7 • 1981

УДК 547.964.4:543.422.23

КОНФОРМАЦИОННАЯ ПОДВИЖНОСТЬ АНГИОТЕНЗИНА И НЕКОТОРЫХ ЕГО АНАЛОГОВ, ВЫЯВЛЕННАЯ ПО ВРЕМЕНАМ СПИН-РЕШЕТОЧНОЙ РЕЛАКСАЦИИ ЯДЕР ^{13}C

Секацис И. П., Лиепиньш Э. Э., Аницанс Ю. Е., Берга Д. А., Чипенс Г. И.

Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига

Изучены спектры ^{13}C-ЯМР и определены времена спин-решеточной релаксации T_1 ядер углерода-13 ангиотензина и четырех его аналогов. Показано, что конформационная подвижность С-концевых аминокислотных остатков ангиотензина ограничена при pH 4,0. Протонирование α-карбоксильной группы приводит к повышению мобильности как С-концевой части, так и всей молекулы ангиотензина.

Экспериментальное изучение структурно-функциональной организации и механизма действия ангиотензина (АТ) проводится главным образом косвенными методами — путем синтеза и изучения биологической активности его аналогов. При таком подходе порой невозможно определить, что влияет на биологические свойства: модификация функциональных групп, изменение конформационных свойств молекулы или одновременно и то и другое. Пространственное строение октапептида ангиотензина Asp^1-Arg^2-Val^3-Tyr^4-Val^5/Ile^5-His^6-Pro^7-Phe^8 в последние годы является объектом интенсивных исследований биологов и физикохимиков [1, 2]. Тем не менее однозначных данных о конформации этого гормона пока не получено. По-видимому, это объясняется существованием в растворе определенного равновесия конформеров, которое меняется в зависимости от природы растворителя, а также изменением структуры молекулы при ее взаимодействии с клеточными рецепторами. Подтверждением этому служат, например, исследования биологической активности циклоаналогов брадикинина, которые указывают на то, что в комплексах с различными рецепторами молекула брадикинина имеет различную пространственную структуру [3].

Для исследования конформационной подвижности главной и боковых цепей и сопоставления полученных результатов с биологической активностью нами получены спектры ^{13}C-ЯМР и определены времена спин-решеточной релаксации T_1 ядер углерода в ангиотензине Asn^1-Arg^2-Val^3-Tyr^4-Val^5-His^6-Pro^7-Phe^8 (I) и в следующих его аналогах: [*D*-Tyr^4, Ile^8]AT (II), [aza-Hva^3, Ile^8]AT (III), [*D*-Asn^1, aza-*D*-Hty^4]AT (IV), [Ile^8]AT

Сокращения: (aza-Hva) – остаток аза-α′-гомо-*L*-валина, —NH—CH(CH(CH$_3$)$_2$)—NH—CO—; (aza-*D*-Hty) – остаток аза-α′-гомо-*D*-тирозина, —NH—CH(CH$_2$—C$_6$H$_4$OH)—NH—CO—.

(V) (см. табл. 1; N — число протонов, присоединенных к углероду). Отнесение сигналов в спектрах к определенным углеродам проведено с использованием литературных данных [4, 5] и времен спин-решеточной релаксации T_1. Идентификация большинства карбонильных групп нами не произведена, однако уточнены значения химических сдвигов (ХС) α-углерода в аспарагине и тирозине, которые в работе [6] указаны ошибочно. ХС для C^{α} остатка Tyr[4] в ангиотензине должен иметь величину 55,70 м.д., а не 57,28 [6], поскольку указанное нами значение совпадает с ХС этого углерода в [Asp[1], Ile[5]]АТ (55,81 м.д.) [4] и в тетрапептиде Val-Tyr-Val-His (55,83 м.д.) [5]. Резонансный сигнал при 50,86 м.д. с длинным временем релаксации (T_1 370 мс, табл. 1) следует, по-видимому, отнести к C^{α} остатка Asn[1], поскольку его ХС близок к величине 51,3—51,8 м.д., характерной для резонанса этого углерода в спектрах ^{13}C-ЯМР белков.

Систематическими исследованиями спектров ^{13}C линейных олигопептидов показано, что ХС углеродов в неконцевых остатках аминокислот не зависят от природы соседних аминокислот, за исключением пролина [7, 8]. Основные изменения ХС определенных аминокислотных остатков происходят главным образом за счет различий в пространственной структуре пептидов. Найденное ХС ^{13}C ангиотензина и его аналогов (II)—(V) совпадают в пределах 1 м.д. со значениями в денатурированных белках [9]. Это свидетельствует об отсутствии сильных внутримолекулярных контактов в изученных пептидах. В условиях получения спектров ^{13}C-ЯМР (pH 1,2—4,6) для соединений (I)—(V) не были обнаружены сигналы, относящиеся к *цис*-конформеру относительно пептидной связи His[6]-Pro[7]. Этот результат согласуется с данными работы [10], где показано, что значительная доля (16%) *цис*-изомера в молекуле появляется лишь при pH>6.

Времена спин-решеточной релаксации T_1 ядер ^{13}C дают ценную информацию о динамике конформационных переходов в пептидах. Доминирующим механизмом релаксации протонированных углеродов больших молекул является диполь-дипольное взаимодействие [11]. Наблюдаемые значения T_1 связаны с эффективным временем корреляции движения вращательной переориентации соотношением [12]

$$\frac{1}{NT_1} = \frac{\hbar^2\gamma_C^2\gamma_H^2}{10r^6}\left[f(\omega_H - \omega_C) + 3f(\omega_C) + 6f(\omega_H + \omega_C)\right], \qquad (1)$$

где $f(\omega)=\tau_{эфф}/(1+\omega^2\tau_{эфф}^2)$; ω_H и ω_C — угловые частоты резонансов ядер ^1H и ^{13}C; γ_H и γ_C — гиромагнитные соотношения для ядер ^1H и ^{13}C; r — усредненное расстояние между ядрами C—H; N — число протонов, присоединенных к углероду; $\hbar$ — постоянная Планка, деленная на 2π. Эффективное время корреляции — функция скоростей переориентации молекулы $\tau_{мол}$ и внутреннего движения $\tau_{внутр}$ [11—13]. Разделить эти два члена в общем случае весьма сложно. Показано [4, 14], что значения NT_1 мало чувствительны к форме молекулы. Основной вклад в величину NT_1 дает сегментное внутреннее движение, которое, очевидно, необходимо учитывать при описании движения главной цепи пептида. Время корреляции внутреннего движения относительно связей C—C боковых цепей не зависит от общей конформации [15] и отражает в основном взаимодействие между боковыми радикалами [5]. При выполнении условий предельного сужения $(\omega_H+\omega_C)\tau_{эфф}\ll 1$ большее значение NT_1 соответствует более мобильному углероду. Так, в линейных пентапептидах типа Gly-Gly-X-Gly-Gly, где X — любая аминокислота, мобильность остова увеличивается от середины пептида к концам, о чем свидетельствует постепенное увеличение значений NT_1. Последние для концевых α-углеродов в 2—4 раза больше, чем у центрального остатка [7]. В пептидах, содержащих объемистые боковые радикалы, различия между величинами NT_1 для концевых и средних α-углеродов меньше, что связано с более ограниченной под-

Таблица 1

Химические сдвиги ^{13}C (δ, м.д.) и значения NT_1 аналогов ангиотензина (I)–(V) в ^2H_2O

Соединение	(I) pH 4,0 δ	(I) pH 4,0 NT_1	(I) pH 1,2 δ	(I) pH 1,2 NT_1	(II) pH 3,8 δ	(II) pH 3,8 NT_1	(II) pH 1,4 δ	(II) pH 1,4 NT_1	(III) [3*] pH 4,6 δ	(III) [3*] pH 4,6 NT_1	(IV) [4*] pH 4,2 δ	(IV) [4*] pH 4,2 NT_1	(V) pH 4,3 δ	(V) pH 4,3 NT_1
Asn C^α	50,86	370	50,78	450	50,82	360	50,78	340	50,82	370	50,92	370	50,81	320
C^β	35,93	610	35,89	800	35,93	530	35,85	500	35,89	590	36,11	620	36,15	510
C=O	169,80	–	169,71	–	169,80	–	169,71	–	169,80	–	–	–	169,49	–
Arg C^α	54,49	210	54,49	260	54,45	210	54,45	200	54,71	260	54,53	310	54,53	210
C^β	29,24	320	29,24	410	29,33	290	29,24	300	29,07	340	29,59	370	29,42	290
C^γ	25,23 [1*]	420 [2*]	25,23 [1*]	470 [2*]	25,62 [1*]	460 [2*]	25,71 [1*]	430 [2*]	25,58 [1*]	580 [2*]	25,36	450 [2*]	25,40 [1*]	480 [2*]
C^δ	41,59	640	41,59	840	41,67	520	41,63	580	41,59	670	41,54	580	41,72	560
C^ε	157,93	–	157,93	–	157,93	–	157,89	–	157,93	–	157,93	–	157,55	–
Val[3] C^α	60,23	170 [2*]	60,23	160 [2*]	60,45	160 [2*]	60,49	160 [2*]	63,25	180	60,40	180	60,29	160 [2*]
C^β	31,27	210 [2*]	31,27	250 [2*]	31,23	190	31,19	200	32,91	240	31,32 [1*]	220	31,42	200 [2*]
C^γ	19,32	1260 [2*]	19,32	1340 [2*]	19,23	1220 [2*]	19,19	1220 [2*]	18,55 [1*]	1460	19,41 [1*]	1320 [2*]	19,51	1170 [2*]
C^γ	18,72	1440 [2*]	18,72	1830 [2*]	18,54	1380 [2*]	18,59	1390 [2*]	18,22 [1*]	1710	18,33	1480 [2*]	18,93	1320 [2*]
Tyr C^α	55,70	180	55,74	180	56,26	180	56,26	150	56,13	180	59,58	170	55,76	140
C^β	37,31	230	37,31	300 [2*]	37,49	240	37,36	230 [2*]	38,05	470 [2*]	40,29	220	37,44	210
C^γ	129,19	–	129,19	–	129,15	–	129,19	–	129,40	–	129,22	–	129,91	–
C^δ	131,60	220	131,60	270	131,56	200	131,52	210	131,65	280	131,73	230	131,30	210
C^ε	116,50	230	116,46	300	116,76	190	116,72	200	116,50	280	116,59	240	116,29	240
C^ζ	155,64	–	155,60	–	155,73	–	155,73	–	155,60	–	155,56	–	155,30	–
Val[5] C^α	60,23	170 [2*]	60,23	160 [2*]	60,45	160 [2*]	60,49	160 [2*]	60,49	170	61,01	170	60,29	160 [2*]
C^β	31,27	210 [2*]	31,27	250 [2*]	30,71	180	30,71	200	31,06	250	30,97 [1*]	210	31,42	200 [2*]
C^γ	19,32	1260 [2*]	19,32	1340 [2*]	19,23	1220 [2*]	19,19	1220 [2*]	19,23 [1*]	1430	19,32 [1*]	1320 [2*]	19,51	1170 [2*]
C^γ	18,72	1440 [2*]	18,72	1830 [2*]	18,37	1380 [2*]	18,33	1460	18,72 [1*]	1510	18,38	1480 [2*]	18,93	1320 [2*]
His C^α	51,30	170	51,34	220	51,34	150	51,30	160	51,25	170	51,17	220	51,43	160
C^β	27,04	220	26,89	310	27,13	–	26,96	230	27,09	260	27,13	180	27,15	210
C^γ	134,71	340	134,67	400	134,67	220	134,67	270	134,76	–	134,58	310	134,47	280
C^δ	118,75	270	118,74	370	118,79	240	118,75	260	118,70	320	118,75	290	118,62	270
C^ε	129,19	–	129,19	–	129,36	–	129,27	–	129,40	–	129,49	–	129,10	–
C=O	170,87	–	170,70	–	–	–	170,49	–	170,62	–	–	–	170,27	–

Таблица 1 (продолжение)

Соединение		(I)				(II)				(III) 3*		(IV) 4*		(V)	
		pH 4,0		pH 1,2		pH 3,8		pH 1,4		pH 4,6		pH 4,2		pH 4,3	
		δ	NT_i	δ	NT_i	δ	NT_i	δ	NT_i	δ	NT_i	δ	NT_i	δ	NT_i
Pro	C^α	61,83	180	61,52	190	61,82	190	61,44	170	61,83	240	61,87	220	61,85	200
	C^β	30,06	320	30,24	410	30,27	330	30,32	410	30,28	420	30,06	380	30,45	340
	C^γ	25,36 1*	420 2*	25,45 1*	470 2*	25,36 1*	490 2*	25,32 1*	430 2*	25,25 1*	510	25,36	450 2*	25,89 1*	480 2*
	C^δ	48,98	350	48,97	340	49,05	240	49,05	210	49,05	240	48,84	200	49,22	220
Phe	C^α	57,04	260	55,09	320							57,04	340		
	C^β	38,39	340	37,40	300 2*							38,39	360		
	C^γ	138,60	–	137,65	–							138,60	–		
	C^δ	130,53	480	130,44	600							130,53	500		
	C^ε	129,62	470	129,84	560							129,62	560		
	C^ξ	127,89	330	128,28	420							127,90	330		
	C=O	178,21	–	175,66	–							178,30	–		
Ile	C^α					60,45	160 2*	58,76	280	61,01	320			61,01	250
	C^β					38,05	260	37,36	230 2*	38,05	240 2*			38,16	270
	C^{γ_1}					25,62 1*	460 2*	25,53 1*	500 2*	25,58 1*	580 2*			25,79 1*	480 2*
	C^{γ_2}					16,34	2080	16,04	2460	16,34	2940			16,54	2080
	C^δ					11,86	3360	11,60	3530	11,81	4200			12,01	3270
	C=O					–	–	–	–	179,07	–			178,62	–

Примечание: 1* — отнесение может быть обратным, 2* — значения NT_i усреднены из-за перекрывания сигналов, 3* — параметры остатка aza-Hva[3] указаны в рубрике Val[3], 4* — параметры остатка aza-*D*-Hty[4] указаны в рубрике Tyr[4].

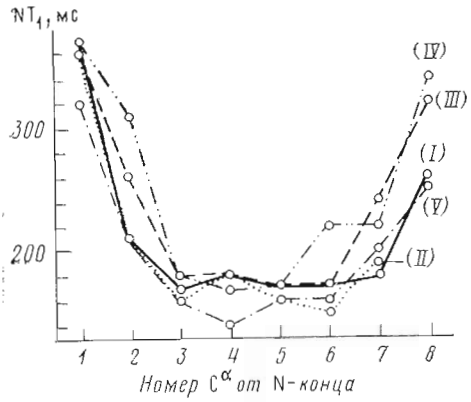

Рис. 1

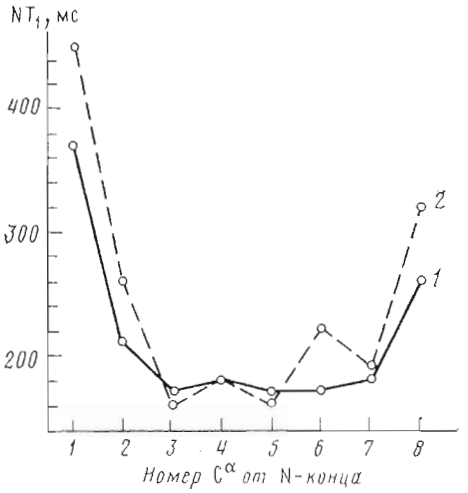

Рис. 2

Рис. 1. Значения NT_1 α-углеродов аналогов АТ (I) – (V) как функция положения C^{α} от N-конца пептида при 42° С и pH~4 в растворе ^2H_2O

Рис. 2. Значения NT_1 α-углеродов ангиотензина в ^2H_2O при 42° С и pH 4,0 (*1*), 1,2 (*2*)

вижностью остова и/или однородностью внутренних движений. Времена спин-решеточной релаксации α-углеродов в циклопептиде грамицидине S различаются не более чем на 15% [13].

Времена релаксации T_1 α-углеродов главной цепи пептидов (I)–(V) находятся в пределах 370—140 мс (табл. 1). Во всех соединениях два N-концевых аминокислотных остатка проявляют повышенную конформационную подвижность. Значения NT_1 для них примерно в 2 раза больше, чем для остатков в положениях 3—6 (табл. 1, рис. 1), что указывает на более свободное внутреннее движение в этой части молекулы. Поэтому мало вероятно существование факторов, стабилизирующих конформацию типа β-изгиба в N-концевой части гормона [16], или ион-дипольной связи между N- и С-концами [17] в водной среде. Отсутствие определенной конформации в N-концевой части ангиотензина хорошо коррелирует с данными биологических исследований аналогов, модифицированных в положении 1 и 2, а также аналогов, укороченных с N-конца. Показано [18], что при любой модификации в положениях 1 и 2 сохраняется специфическая биологическая активность, часто значительная. Удаление N-концевых аминокислотных остатков лишь понижает активность, не изменяя характера действия.

Время спин-решеточной релаксации C^{α} остатка Phe^8 меньше, чем у N-концевой аминокислоты, однако больше, чем у средних остатков в ангиотензине. Это может свидетельствовать о некоторой ограниченности движения С-конца по сравнению с N-концом, что наблюдается как в агонистах, так и в антагонистах. Такой вывод согласуется с моделями, предполагающими стабилизацию конформации С-конца в виде изгибов [19, 20]. Введение аза-α′-гомоаминокислот (соединения (III) и (IV)) существенно повышает мобильность концевых аминокислот, в том числе и С-конца. Данные теоретического конформационного анализа остатков аза-α′-гомоаминокислот также говорят об их повышенной мобильности [21]. Протонирование α-карбоксильной группы вызывает увеличение времен релаксации ангиотензина (рис. 2), что, вероятно, связано с разрушением несколько более стабилизированной конформации, существующей при pH

4,0. Спектры КД также указывают на конформационный переход в молекуле ангиотензина в районе pH 1—4 [16]. Напротив, совпадение в пределах ошибок значений NT_1 остова аналога (II) при pH 1,4 и 3,8 (табл. 1) свидетельствует об отсутствии изменений в конформационной подвижности. Определение времен спин-решеточной релаксации T_1 при pH, близких к физиологическим, было невозможно из-за низкой растворимости соединений в этих условиях.

К сожалению, количественное сравнение значений NT_1 из табл. 1 с известными литературными данными [4, 15] невозможно из-за различий в частотах спектрометров и температуре. Кроме того, в работах [4, 15] были использованы другие аналоги ангиотензина: [Asp^1, Ile^5]AT и [Asp^1, Ile^5, Leu^8]AT. Для этих аналогов резонансы α-углеродов концевых аминокислот перекрываются с другими сигналами, поэтому найденные значения NT_1 в [4] являются усредненными и не могут быть использованы для определения мобильности.

Времена спин-решеточной релаксации T_1 α-углеродов остатков 2—7 нами были использованы для определения среднего времени релаксации, которое затем, согласно уравнению (1), применялось для расчета эффективного времени корреляции. $\tau_{эфф}$ меняется в соединениях (I)—(V) от $2{,}2 \cdot 10^{-10}$ до $2{,}9 \cdot 10^{-10}$ с (табл. 2), что находится в пределах экспериментальной ошибки ($\pm 16\%$).

Хотя данные времен спин-решеточной релаксации получены при pH 4, интересно сопоставить конформационную подвижность с биологической активностью. Наблюдается существенное усиление ингибирующих свойств и понижение нежелательной прессорной реакции специфического антагониста [Ile^8]AT (соединение (V)) при увеличении его конформационной подвижности, вызванной заменой валина в положении 3 на аза-α'-гомовалин (соединение (III)) (значения pA_2 в табл. 3 соответственно 8,2 и 9,7). Такая же модификация в ангиотензине (аналог (VI)) в 5 раз уменьшает его прессорную активность и приводит к появлению значительной антагонистической активности (табл. 3). Времена релаксации T_1 у аналога (II) примерно такие же, как у соединений (I) и (V), однако биологическая активность полностью отсутствует. В этом случае, вероятно, первостепенную роль играет не подвижность остова (она приблизительно одинакова в (I), (II) и (V)), а иная ориентация боковых цепей остатков Tyr^4 и His^6 в связи с заменой *L*-Tyr на *D*-Tyr, что исключает возможность связывания с рецептором. При одинаковой ориентации активность зависит от конформационной подвижности молекулы.

Подвижность боковых цепей мало меняется при переходе от соединения (I) к (V). Относительно малая подвижность боковой цепи аргинина [4] сохраняется в пептидах (I)—(V) и не зависит от степени ионизации С-концевой аминокислоты. Это указывает на отсутствие ион-дипольного взаимодействия между гуанидиновой и α-карбоксильной группами в водном растворе [22]. Значения NT_1 в валинах примерно в 9 раз больше для CH_3-групп, чем для α-углеродов. Большие NT_1-величины для углеродов метильных групп валиновых остатков свидетельствуют об отсутствии каких-либо стерических факторов, ограничивающих их быстрое вращение [12]. Фенольное кольцо тирозина в соединениях (I) и (IV) несколько менее подвижно, чем фенильное кольцо фенилаланина.

Таким образом, полученные данные говорят о свободном сегментном движении N-концевой части ангиотензина. Предыдущие исследования ангиотензина методом ЯМР [23—25] и КД [26] свидетельствуют о взаимном влиянии боковых цепей остатков Tyr^4 и His^6. Этот факт авторами работ [23—26] интерпретируется как доказательство вытянутой структуры для фрагмента Tyr^4-Val^5-His^6. Полученные в настоящей работе результаты не противоречат этой гипотезе, которая основывается на стабилизирующей роли объемистого бокового радикала остатка Val^5 в ориентации остатков Tyr^4 и His^6 [23—25]. Но вместе с тем значения NT_1 для α-углеродов глав-

Таблица 2

Средние значения NT_1 (мс) углеродов остова аналогов ангиотензина (I)–(V) и эффективные времена корреляции $\tau_{эфф}$ (с)

Соединение pH	(I)		(II)		(III)	(IV)	(V)
	4,0	1,2	3,8	1,4	4,6	4,2	4,3
NT_1	180	195	175	167	200	210	171
$\tau_{эфф} \cdot 10^{10}$	2,6	2,4	2,7	2,9	2,3	2,2	2,7

Таблица 3

Биологическая активность ангиотензина и его аналогов

Соединение	Прессорная активность, %	pD_2*	pA_2**	Литература
(I) Ангиотензин	100	9,7	–	[18, 32]
(II) [*D*-Tyr^4, Ile^8]AT	0	Неактивный		
(III) [aza-Hva^3, Ile^8]AT	0,1	–	9,7	
(IV) [*D*-Asn^1, aza-*D*-Hty^4]AT	18	8,3	–	[28, 30]
(V) [Ile^8]AT	1,0	–	8,2	[31]
(VI) [aza-Hva^3]AT	20	8,2	9,2	[28]

* pD_2 — показатель специфического сродства агонистов к рецепторам ангиотензина (colon ascendens крысы) — отрицательный логарифм концентрации агониста, при которой он развивает 50% эффект от максимального значения.

** pA_2 — величина, характеризующая конкурентный антагонизм аналогов в отношении ангиотензина (colon ascendens крысы) — отрицательный логарифм концентрации антагониста, при которой концентрацию агониста необходимо удвоить для получения исходного эффекта.

ной цепи ангиотензина доказывают наличие факторов, ограничивающих конформационную подвижность С-концевой части молекулы. Таким фактором может служить изгиб, стабилизированный пролиновым остатком и внутримолекулярной водородной связью [27].

Экспериментальная часть

Синтез и свойства использованных соединений (IV)–(VI) описаны в работах [28–32]; соединения (II) и (III) получены и охарактеризованы аналогично. Биологические исследования аналогов (I)–(VI) проведены в лаборатории молекулярной биологии и фармакологии пептидов Института органического синтеза АН ЛатвССР под руководством В. Е. Клуши.

Спектры ^{13}C-ЯМР с полным подавлением спин-спинового взаимодействия ядер углерода и протонов получены на спектрометре WH-90 на рабочей частоте 22,63 МГц. Температура образца 42° С, концентрация растворов 0,1 М, количество накоплений для одного спектра 9000. ХС измерены относительно диоксана как внутреннего стандарта, величина химического сдвига которого относительно тетраметилсилана (TMS) была принята равной 67,61 м.д., точность измерения δ ±0,05 м.д.

Значения pH раствора определяли с помощью комбинированного стеклянного электрода на pH-метре OP-208 (Radelkis, Венгрия) при 20° С. Приведенные в работе pH соответствует показаниям pH-метра в ^2H_2O.

Времена спин-решеточной релаксации T_1 определены с использованием импульсной последовательности $(180°=\tau=90°=T_\infty)_n$, где τ (задержка между импульсами 180° и 90°) менялась в пределах 20–400 мс, T_∞=2 с, n=9000. T_1 определены методом корреляции трех параметров [33] с использованием 9 спектров. Точность определения T_1 ±10%.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Галактионов С. Г., Никифорович Г. В., Чипенс Г. И., Шендерович М. Д.* Ангиотензин: молекулярные механизмы действия. Рига: Зинатне, 1979, с. 21–77.
2. *Smeby R. R., Fermandjian S.* Conformation of angiotensin II.— In: Chemistry and biochemistry of amino acids, peptides and proteins. / Weinstein B., ed. New York — Basel: Marcel Dekker, 1978, v. 5, p. 117–162.
3. *Chipens G., Nikiforovich G., Mutulis F., Veretennikova N., Vosekalna I., Sosnov A., Polevaya L., Ancans J., Mishlyakova N., Liepinsh E., Sekacis I., Breslav M.* Cyclic analogs of linear peptides.— In: Peptides structure and biological function. Proceedings of the sixth american peptide symposium. / Gross E., Meienhofer J., eds. Rockford, Illinois: Pierce Chemical Company, 1979, p. 567–570.
4. *Deslauriers R., Paiva A. C. M., Schaumburg K., Smith I. C. P.* Conformational flexibility of angiotensin II. A carbon-13 spin-lattice relaxation stydy.— Biochemistry, 1975, v. 14, № 5, p. 878–886.
5. *Секацис И. П., Лиепиньш Э. Э., Анцанс Ю. Е., Чипенс Г. И.* Спектры ЯМР-^{13}С среднего тетрапептида ангиотензина.– Изв. АН ЛатвССР. Сер. хим., 1980, № 5, с. 614–620.
6. *Zimmer S., Haar W., Maurer W., Rüterjans H., Fermandjian S., Fromageot P.* Investigation of the structure of angiotensin II using ^{13}C nuclear magnetic resonance spectra.— Eur. J. Biochem., 1972, v. 29, № 1, p. 80–87.
7. *Keim P., Vigna R., Nigen A. M., Morrow J. S., Gurd F. R. N.* Carbon-13 NMR of pentapeptides of glycine containing central residues of methionine, proline, arginine and lysine.— J. Biol. Chem., 1974, v. 249, № 13, p. 4149–4156.
8. *Grathwohl Ch., Wüthrich K.* Carbon-13 NMR of the protected tetrapeptides TFA-Gly-Gly-*L*-X-Ala-OCH_3, where X stands for the 20 common amino acids.— J. Magn. Reson., 1974, v. 13, № 2, c. 217–225.
9. *Howarth O. W., Lilley D. M. J.* Carbon-13 NMR of peptides and proteins.-- Progress in NMR spectroscopy, 1978, v. 12, p. 1–40.
10. *Bleich H. E., Freer R. J., Stafford S. S., Galardy R. E.* Correlation of the biological activity and solution conformation of [Asp^1, Ile^5]- and [Phe^4, Tyr^8]angiotensin II.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, № 8, p. 3630–3634.
11. *Doddrell D., Glushko V., Allerhand A.* Theory of NOE and ^{13}C — ^{1}H dipolar relaxation in proton-decoupled carbon-13 NMR spectra of macromolecules.— J. Chem. Phys., 1972, v. 56, № 7, p. 3683–3689.
12. *Allerhand A., Doddrell D., Komoroski R.* Natural abundance carbon-13 partially relaxed fourier transform NMR spectra of complex molecules.— J. Chem. Phys., 1971, v. 55, № 1, p. 189–198.
13. *Allerhand A., Komoroski R. A.* Study of internal rotations in gramicidin S by means of carbon-13 spin-lattice relaxation measurements.– J. Amer. Chem. Soc., 1973, v. 95, № 25, p. 8228–8231.
14. *Deslauriers R., Somorjai R. L.* Internal rotations of side chains and backbone in luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH). Analysis of carbon-13 spin-lattice relaxation times.— J. Amer. Chem. Soc., 1976, v. 98, № 7, p. 1931–1939.
15. *Deslauriers R., Ralston E., Somorjai R. L.* Conformational studies on angiotensin II. Least-squares fit of carbon-13 NMR relaxation times to extended and folded conformations.— J. Mol. Biol., 1977, v. 113, № 5, p. 697–710.
16. *Fermandjian C., Lintner K., Haar W., Fromageot P., Khosla M. C., Smeby R. R., Bumpus F. M.* Conformation-function relationship of angiotensin II and analogs.— In: Peptides 1976. Proceedings of the 14th European Peptide Symposium, Wepion, Belgium, 1976, p. 339–352.
17. *Juliano L., Paiva A. C. M.* Conformation of angiotensin II in aqueous solution. Titration of several peptide analogs and homologs.— Biochemistry, 1974, v. 13, № 11, p. 2445–2450.
18. *Khosla M. C., Smeby R. R., Bumpus F. M.* Structure — activity relationship in angiotensin II analogs.— In: Handbook of experimental pharmacology. / Page I. H., Bumpus F. M., eds. Berlin: Springer-Verlag, 1974, v. 37, p. 126–161.
19. *Fermandjian S., Pradelles P., Fromageot P., Dunand J. J.* Proton NMR studies on thyrothropin releasing factor.—FEBS Lett., 1972, v. 28, № 2, p. 156–160.
20. *Weinkam R. J., Jorgensen E. C.* Angiotensin II analogs. VIII. The use of free radical containing peptides to indicate the conformation of the carboxyl terminal region of angiotensin II.— J. Amer. Chem. Soc., 1971, v. 93, № 25, p. 7033–7038.
21. *Балодис Ю. Ю., Вегнер Р. Э., Никифорович Г. В., Чипенс Г. И.* Теоретический конформационный анализ метиламидов N-ацетил-аза-α′-гомо-*L*-аминокислот.– Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 4, с. 481–488.
22. *Никифорович Г. В., Шендерович М. Д., Галактионов С. Г.* Теоретический конформационный анализ молекулы ангиотензина.– Биоорган. химия, 1976, т. 2, № 9, с. 1268–1270.
23. *Fermandjian S., Piriou F., Lintner K., Toma H., Lam-Than H., Fromageot P., Khosla M. C., Smeby R. R., Bumpus F. M.* Arrangement of the amino acid side chains in angiotensin II.— In: Peptides structure and biological function. Proceeding of the

sixth american peptide symposium. / Gross E., Meienhofer J., eds. Rockford, Illinois: Pierce Chemical Company, 1979, p. 205–208.
24. *Piriou F., Lintner K., Fermandjian S., Fromageot P., Khosla M. C., Smeby R. R., Bumpus F. M.* Amino acid side chain conformation in angiotensin II and analogs: correlated result of CD and ^{1}H-NMR.– Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, № 1, p. 82–86.
25. *Секацис И. П., Лиепиньш Э. Э., Анцанс Ю. Е., Чипенс Г. И.* Исследование пространственной структуры среднего тетрапептида ангиотензина методом спектроскопии ЯМР ^{1}Н.– Изв. АН ЛатвССР. Сер. хим., 1980, № 3, с. 349–353.
26. *Lintner K., Fermandjian S., Fromageot P., Khosla M. C., Smeby R. R., Bumpus F. M.* pH Titration effects on the CD spectra of angiotensin II truncated peptides and other analogues: aromatic region.— FEBS Lett., 1975, v. 56, № 2, p. 366–369.
27. *Weinkam R. J., Jogensen E. C.* Angiotensin II analogs. IX. Conformational studies of angiotensin II by PMR.— J. Amer. Chem. Soc., 1971, v. 93, № 25, p. 7038–7044.
28. *Chipens G., Ancan J., Afanasyeva G., Balodis J., Indulen J., Klusha V., Kudryashova V., Liepinsh E., Makarova N., Mishlyakova N.* Structure and biological activity of angiotensin analogues comprising aza-α′-homoamino-acids.— In: Peptides 1976. Proceedings of the 14th European Peptide Symposium, Wepion, Belgium, 1976, p. 353–360.
29. *Чипенс Г. И., Павар А. П., Клуша В. Е., Анцанс Ю. Е., Кибирев В. К.* Синтез и исследование миотропной активности некоторых фрагментов (5-валин) ангиотензина.– Химия природн. соед., 1973, № 1, с. 77–83.
30. *Анцанс Ю. Е., Чипенс Г. И.* Синтез фрагментов и аналогов (1-аспарагин, 5-валин) ангиотензина II с энантиомерными формами тирозина и азагомотирозина.– Биоорган. химия, 1975, т. 1, № 10, с. 1410–1417.
31. *Анцанс Ю. Е., Чипенс Г. И.* Синтез (1-аспарагин, 5-валин-, 8-*изо*-лейцин)-ангиотензина II.– Изв. АН ЛатвССР. Сер. хим., 1978, № 1, с. 89–93.
32. *Мышлякова Н. В., Индулен Ю. И., Клуша В. Е., Чипенс Г. И.* Применение специфических ингибиторов ангиотензина при исследовании гормон-рецепторного взаимодействия.– Биохимия, 1976, т. 41, вып. 6, с. 1008–1012.
33. *Kowalewski J., Levy G. C., Johnson L. F., Palmer L.* A three-parameter non-linear procedure for fitting inversion-recovery measurement of spin-lattice relaxation times.— J. Magn. Reson., 1977, v. 26, № 3, p. 533–536.

Поступила в редакцию
5.VIII.1980
После доработки
20.I.1981

CONFORMATIONAL MOBILITY OF ANGIOTENSIN AND SOME ANALOGS REVEALED BY ^{13}C SPIN-LATTICE RELAXATION TIMES

SEKACIS I. P., LIEPINSH E. E., ANSANS Yu. E., BERGA D. A., CHIPENS G. I.

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

22,63 MHz proton-decoupled ^{13}C nuclear magnetic resonance spectra were taken and ^{13}C spin-lattice relaxation times T_1 measured for aqueous solutions of angiotensin and four its analog. It was found that different segments of angiotensin backbone are not equally restricted in their motion. Conformational mobility of the residues belonging to the C-terminal part is low at pH 4.0. Protonation of α-carboxyl group entails an increase in mobility of the C-terminal portion, as well as of the whole angiotensin molecule.