

β -转角肽的溶液构象*

高峰¹ 沙印林^{1,2} 邱阳² 王跃丰³ 李银玲¹ 来鲁华¹ 吴厚铭³

(¹ 北京大学物理化学研究所, 化学与分子工程学院 分子动态与稳态国家重点实验室, 北京 100871;

² 北京大学基础医学院, 生物物理系, 北京 100083; ³ 中国科学院上海有机化学研究所, 上海 200032)

摘要 主要报导 TEM-1 β -内酰胺酶的天然蛋白类抑制剂 BLIP 中一段多肽 B1 的溶液构象研究结果. 在磷酸盐缓冲溶液中, 通过圆二色光谱、傅立叶红外光谱和核磁共振谱研究了 B1 的二级结构特征. 实验结果表明, B1 在溶液中形成了 β -转角结构, 为在溶液中单独研究 β -转角结构形成与稳定性提供了良好的模板. β -转角在溶液中可以独立存在, 表明 β -转角在蛋白质折叠过程中可能具有重要作用.

关键词: β -转角结构, 圆二色光谱, 傅立叶红外光谱, 核磁共振光谱, 多肽

研究蛋白质二级结构的形成与稳定性是了解蛋白质折叠过程与机理的基础. 过去, 人们利用圆二色、红外、拉曼和核磁共振等光谱技术, 对大量的蛋白质片段与全新设计的多肽进行了结构研究, 在蛋白质二级结构形成与稳定性方面有了一定的理解和认识. 到目前为止, 人们对 α -螺旋结构的研究最为广泛和深入. 80 年代以来, 涉及 β -折叠结构研究的相关报导也逐年增加, 其中以 β -发卡结构研究最具代表性^[1-3]. β -发卡结构为在溶液中研究反平行 β -折叠结构提供了良好的模板. 作为 β -发卡结构的重要组成部分, β -转角结构也是一种常见的蛋白质二级结构, 它在球蛋白中广泛存在. 然而, 到目前为止, 涉及 β -转角结构的研究相对较少, 主要是因为 β -转角结构在溶液中很难独立存在, 缺少合适的研究模板.

1996 年, Strynadka 等报导了 BLIP 与 TEM-1 β -内酰胺酶的复合物晶体结构^[4-6]. TEM-1 是细菌产生的一种 β -内酰胺酶, 它能高效水解青霉素和头孢菌素, 从而使细菌对青霉素和头孢菌素等抗菌素产生抗药性. BLIP 是目前效果最好的 TEM-1 蛋白类抑制剂(抑制常数 $K_i \sim 0.6$ nm). 晶体结构表明, 来自 BLIP 第一结构域中的一段 β -转角结构(46 ~ 51)AAGDYY 与 TEM-1 β -内酰胺酶的活性位点结合, 从而抑制其生物活性. 我们认为, 这段多肽的

结构简单, 构象相对稳定, 可以用来作为 β -转角结构形成与稳定性研究的模板.

1 多肽合成与纯化

多肽 B1(AAGDYY-NH₂)由 Fmoc(a-fluorenylmethoxy-carbonyl)保护的氨基酸通过固相合成技术在 Rink 树脂上制备得到. 氨基酸预活化试剂为 HBTU/*N*-甲基吡咯烷酮, 肽偶联催化剂为 *N,N*-二异丙基乙胺, Fmoc 脱保护试剂为 40% 哌啶/*N,N*-二甲基甲酰胺, 切割试剂为三氟乙酸、苯甲硫醚、1, 2-二巯基乙烷、苯酚和水的混合溶液^[7]. 粗品肽经反相高效液相色谱(Gilson HPLC)在 ZORBAX C₁₈ 柱上分离得到. 乙腈和水(TFA 0.1%)为流动相. 肽纯度分别经过分析型高效液相色谱与基质辅助激光解吸飞行时间质谱鉴定(实测 m/e 值 658/理论值 657).

2 实验结果

2.1 圆二色光谱

20℃下, 在 50 mmol · L⁻¹ 磷酸盐缓冲体系中, 通过 Jobin Yvon CD6 圆二色仪测定了不同肽浓度的远紫外圆二色光谱. 结果显示, 肽浓度对光谱无影响, 说明多肽 B1 在实验条件下不发生聚集. 在扣除缓冲液本底后, 我们得到了 B1 在 50 mmol ·

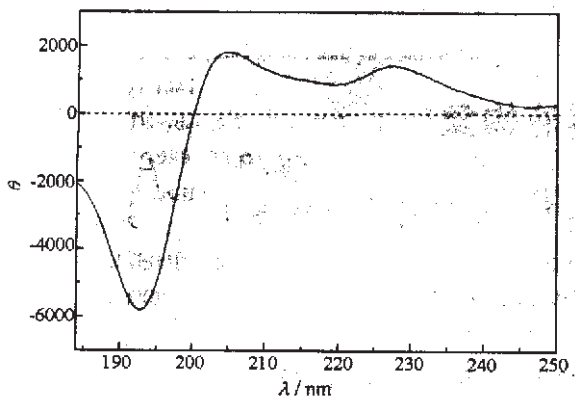


图 1 多肽 B1 ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 在 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液中的圆二色光谱图

Fig. 1 The CD spectrum of peptide B1 ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) in $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ phosphate buffer, 20°C

L^{-1} 磷酸盐缓冲液中的圆二色光谱图(图 1)。

2.2 红外光谱

20°C 下, 在 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐(重水)缓冲体系中, 我们测定了多肽 B1 ($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的红外光谱(图 2)。结果表明, 多肽 B1 在水溶液中形成了

表 1 多肽 B1 红外光谱的归属

Table 1 Band position, area percentage and assignment of FT-IR spectrum for peptide B1

Band position (cm^{-1})	area (%)	assignment
1681	2	β -turn
1668	16	β -turn
1648	79	β -turn + unordered
1613	3	Tyr residues

β -转角结构。红外峰位的归属见表 1^[8]。

2.3 核磁共振光谱

二维核磁共振实验在 Varian Inova 600 核磁共振仪上完成(^1H 频率为 600.15 MHz)。实验条件分别为: 样品浓度 $3.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液($\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}=9:1$), pH 为 5.6, 20°C ; 样品浓度为 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{DMSO}-d_6$ 溶液, pH 为 2.8, 24°C 。

3 讨论

我们通过圆二色、红外和核磁共振谱研究了多肽 B1 在溶液中的二级结构特征。实验结果表明, 多肽 B1 在溶液中形成了 β -转角结构。

在圆二色光谱中, 227 nm 的正峰代表 $n \rightarrow \pi^*$

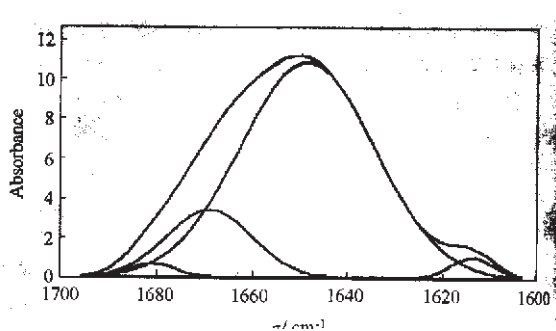


图 2 多肽 B1 在 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液中的红外光谱图

Fig. 2 The FT-IR spectrum of peptide B1 in $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ phosphate buffer, 20°C

跃迁, 200 nm 和 205 nm 之间的正峰 203 nm 代表 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁。 β -转角结构对这两处正峰有重要贡献, 这些圆二色特征与 Woody 理论计算结果和曾报导的 β -转角圆二色谱非常相符^[9,10]。 192.5 nm 处的圆二色负峰主要为无规卷曲构象的贡献。文献表明, β -转角在 $180 - 190 \text{ nm}$ 间也有一个很强的负吸收峰^[9], 故我们推测 192.5 nm 处的吸收为 β -转角结构和无规卷曲构象共同作用结果。红外光谱的结果同样表明, B1 在溶液中形成了 β -转角结构, 其中 1681 cm^{-1} 和 1668 cm^{-1} 两处的吸收峰是 β -转角结构形成的有利证据。表 1 中数据说明, 至少有 18% 以上的 B1 在水溶液中形成了 β -转角结构。由于 B1 在溶液中只存在 β -转角与无规卷曲两种构象, 所以 B1 可以用来作为研究 β -转角结构形成与稳定性的模板。

NOESY 光谱的特征 NOE 信号(图 3)有力地支持了 B1 在 DMSO 中形成了 β -转角结构的看法。核磁共振研究表明, 在 DMSO 中, B1 中 GD 片段的二面角 φ, ψ 分别为 $(-52^\circ, -32^\circ)$ 和 $(-38^\circ, -44^\circ)$, 属于 III 型 β -转角^[11], 而 B1 在 TEM-1/BLIP 复合物晶体结构中以 II' 型 β -转角存在。这表明, β -转角结构的形成不仅与多肽序列有关, 蛋白质的内部环境及远程相互作用对 β -转角结构形成也有重要贡献。在 NOESY 实验中, 我们没有发现氨基酸侧链之间的远程 NOE 信号。这说明, 本实验中股间侧链堆积对稳定 β -转角结构没有贡献。

B1 是在溶液中独立形成 β -转角结构的线性短肽, 对了解 β -转角的形成和稳定性具有重要的意义。B1 在溶液中可独立形成 β -转角结构, 表明 β -

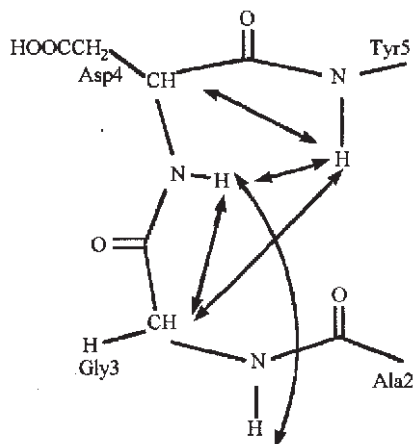


图3 多肽 B1DMSO 中观测到的关键 NOE 信号

Fig. 3 The key NOEs observed for peptide B1 in DMSO

转角在蛋白质折叠过程中可能具有重要作用。同时,由于 B1 的结构相对简单并较为稳定,故可用来作为模板进行新型的 β -内酰胺酶多肽抑制剂设计。

References

- 1 Blanco F J, Jimenez M A, Rico M, Santoro J, Herranz J, Nieto J L. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*: 5887

- 2 Searle M S, Williams D H, Packman L C. *Nat. Struct. Biol.*, **1995**, *2*: 999
- 3 Ramirez-Alvarado M, Blanco F J, Serrano L. *Nat. Struct. Biol.*, **1996**, *3*: 604
- 4 Natalle C J S, Susan E J, Kathy J, Helen B, Malcolm P, Andre M, Jean-Marle Frere, Michael NGJ. *Nature*, **1994**, *368*: 657
- 5 Natalle C J S, Hiroyuki A, Susan E J, Kathy J, Anita S, Christian B, Kazuo S, Michael N G J. *Nature*, **1992**, *359*: 700
- 6 Strynadka N C, Jensen S E, Alzari P M, James M N. *Nat. Struct. Biol.*, **1996**, *3*(3): 290
- 7 Gregg B F, Richard L N. *Res.*, **1990**, *35*: 161
- 8 Jose L R A, Francisco J B, Luis S, Felix M G. *FEBS Letters*, **1996**, *384*: 35
- 9 Alison R, Bengt N. *Circular Dichroism and Linear Dichroism*. Oxford: Oxford University Press, 1997
- 10 Lu ZX, Cui T, Shi QL. *Application of C D and O R D in Molecular Biology*. Beijing: Science Press, 1987. [鲁子贤, 崔涛, 施庆洛. 圆二色性和旋光色散在分子生物学中的应用. 北京: 科学出版社, 1987]
- 11 Lai L H, Qü Chx, Luo Y, Deng QL, Wang YL. *Protein Structure Prediction and Molecular Design*. Beijing: Peking University Press, 1993 [来鲁华, 曲春旭, 罗宇, 邓巧临, 王彦力. 蛋白质的结构预测与分子设计. 北京: 北京大学出版社, 1993]

Solution Conformation Study on a β -turn Forming Peptide*

Gao Feng¹ Sha Yin-Lin^{1,2} Qiu Yang² Wang Yue-Feng³ Li Yin-Ling¹ Lai Lu-Hua¹ Wu Hou-Ming³

(¹ Institute of Physical Chemistry, College of Chemistry and Molecular Engineering, State Key Laboratory for Structural Chemistry of Unstable & Stable Species, Peking University, Beijing 100871; ² Department of Biophysics, The School of Basic Medical Sciences, Peking University, Beijing 100083; ³ Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)

Abstract The model six-residue linear peptide AAGDYY-NH₂ from TEM-1 β -lactamase inhibitor protein and BLIP was predicted to adopt a β -turn conformation and synthesized in order to elucidate the mechanism of β -turn formation and stability. Its structural preferences in solution were comprehensively characterized using CD (circular dichroism), FT-IR and ¹H-NMR spectroscopy. The set of observed short- and medium-range NOEs, the restrained molecular dynamics simulation, CD and FT-IR spectroscopy were consistent with the formation of β -turn in solution by the model peptide. The results implicate β -turn playing an important role in the process of protein folding.

Keywords: β -turn, CD, FT-IR, NMR, Peptide