



УДК 577.112.088.53:543.422.25

© 1990 г.

*А. Л. Ломизе, А. Г. Соболев, А. С. Арсеньев***МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛОКАЛЬНОЙ КОНФОРМАЦИИ
БЕЛКОВ ПО ДАННЫМ СПЕКТРОСКОПИИ ^1H -ЯМР***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва*

Предложен метод определения конформаций аминокислотных остатков в белке (локальной пространственной структуры) и эффективного времени корреляции вращения белковой глобулы τ_c по интегральным интенсивностям (объемам) кросс-пиков ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО), наблюдаемым в спектрах NOESY. Метод заключается в согласовании полной матрицы релаксации протонов для каждого дипептидного фрагмента белка с экспериментальными интенсивностями кросс-пиков ЯЭО путем вариации торсионных углов φ , ψ , χ и времени τ_c . Для проверки метода проведен расчет локальной структуры основного панкреатического ингибитора трипсина (ВРТИ) по интенсивностям кросс-пиков ЯЭО, которые теоретически моделировали для полной матрицы релаксации протонов белка. Интенсивности моделировали в диапазоне времен обмена компонент намагниченности τ_m 25–300 мс на основе экспериментально измеренных времен неселективной спин-решеточной релаксации протонов T_1 , времени корреляции вращения молекулы ВРТИ τ_c и координат протонов, реконструированных по рентгеноструктурным координатам неводородных атомов ВРТИ. Модельный расчет локальной структуры ВРТИ показал, что при времени $\tau_m = 100$ –200 мс, обеспечивающем оптимальное соотношение сигнал/шум в спектрах NOESY, удается однозначно определить торсионные углы основной цепи φ и ψ для всех остатков (кроме глицина) и χ^1 — для большинства боковых цепей белка. Найденные значения углов φ и ψ отличаются от рентгеноструктурных в среднем соответственно на 18 и 9° (максимальные величины отклонений — 44 и 22°), а среднеквадратичное отклонение межпротонных расстояний в полученных конформациях дипептидных фрагментов ВРТИ от кристаллографической структуры белка в среднем составляет 0,08 Å.

Спектроскопия ^1H -ЯМР — наиболее информативный метод исследования пространственной структуры пептидов и небольших глобулярных и мембранных белков (с молекулярной массой до 15 000) как в водном растворе, так и в условиях, имитирующих гидрофобную среду биологических мембран (органические растворители или мицеллы) [1, 2]. Проведя анализ двумерных спектров ядерного эффекта Оверхаузера (NOESY), можно выявить большое число пар пространственно близких протонов и затем с помощью алгоритмов DISGEO или DISMAN определить набор конформаций молекулы, удовлетворяющих полученным ограничениям на попарные расстояния [3, 4]. После статистического анализа полученных конформаций удается установить ход полипептидной цепи в пространстве, т. е. «глобальную» структуру молекулы. При этом локальная структура аминокислотных остатков, характеризуемая торсионными углами φ , ψ , χ , определяется неоднозначно. Стандартное отклонение углов для полученного набора конформаций достигает 60°, а координат атомов колеблется от 1,5 до 4,5 Å [3]. Таким образом, точность определения пространственной структуры белка по данным ЯМР оказывается существенно ниже, чем при рентгеноструктурном анализе высокого разрешения. Это может быть обусловлено недостаточно полным учетом экспериментальной информации, содержащейся в спектрах NOESY. Обычно используется лишь сам факт наличия кросс-пика ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) в спектре NOESY, который интерпретируется как близость протонов на расстояние от 2 до 4–5 Å. Для более точного определения пространственной структуры необходим количественный учет интегральных интенсивностей (объемов) кросс-пиков ЯЭО, непосредственно связанных с межпротонными расстояниями [5–7].

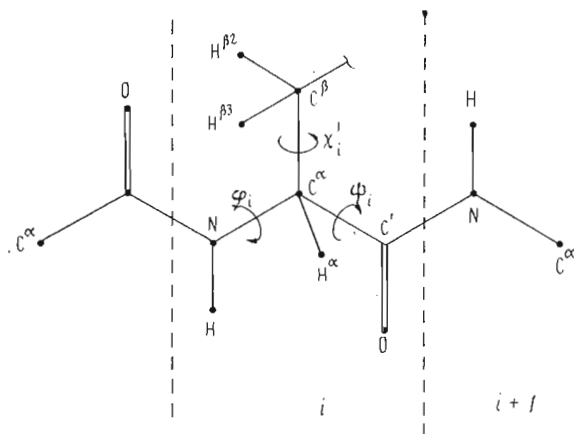


Рис. 1. Дипептидный фрагмент, включающий боковую цепь i -го аминокислотного остатка белка и две соседние пептидные группы. Для боковой цепи показаны только β -протоны. В дальнейшем каждый дипептидный фрагмент идентифицируется по номеру i -го остатка

Поиск пространственной структуры белка путем согласования теоретических и измеренных экспериментально интенсивностей кросс-пиков ЯЭО целесообразно разбить на несколько последовательных этапов. Вначале можно определить значения торсионных углов, обеспечивающие согласование интенсивностей для изолированных дипептидных фрагментов молекулы (рис. 1). Развитию такого подхода и посвящена настоящая работа. Полученные ограничения на величины торсионных углов можно затем использовать для приближенного построения пространственной структуры всей молекулы при помощи алгоритма DISMAN [8, 9]. И наконец, на заключительном этапе расчета может проводиться уточнение трехмерной структуры белка с учетом интенсивностей всех кросс-пиков ЯЭО в молекуле.

При анализе локальной структуры белка вводится два существенных упрощения. Во-первых, взаимодействие протонов рассматривается лишь в пределах дипептидных фрагментов, а передача намагниченности на окружающие протоны белка не учитывается. Во-вторых, идеализируется геометрия полипептидной цепи, поскольку для каждого дипептидного фрагмента оптимизируются только торсионные углы ϕ , ψ , χ , а длинам связей, валентным углам и углу ω пептидных групп присваиваются стандартные значения, которые могут отличаться от реально существующих в белке. Влияние этих упрощений на результаты анализа локальной структуры, а также однозначность определения торсионных углов по интенсивностям кросс-пиков ЯЭО оценивались в настоящей работе путем расчета локальной структуры бычьего панкреатического ингибитора трипсина (ВРТИ), проводившегося на основе модельных интенсивностей кросс-пиков ЯЭО молекулы ВРТИ, приведенных в табл. 1. Эти интенсивности были вычислены теоретически для полной матрицы релаксации протонов ВРТИ на основе координат протонов, реконструированных по кристаллографическим координатам атомов белка [10, 11], времени корреляции вращения белковой глобулы $\tau_c = 4$ нс [12] и времен неселективной спин-решеточной релаксации протонов T_1 , измеренных в настоящей работе для ВРТИ методом «инверсия-восстановление» [13].

Результаты и обсуждение

Математическая модель для поиска локальной структуры белка. Каждый i -й дипептидный фрагмент белка включает протоны i -го аминокислотного остатка и протон NH $i+1$ -го остатка. Расстояния между этими протонами зависят от торсионных углов ϕ_i , ψ_i , χ_i (рис. 1). Эти углы, характеризующие локальную конформацию i -го остатка, определяли путем

Вычисленные по уравнениям (2-6) на основе кристаллографической структуры ВРТИ [10, 11] относительные интенсивности ($I/I_0 \cdot 10^4$) кросс-пиков ЯЭО между протонами дипептидных фрагментов ВРТИ, использованные для модельного расчета локальной структуры ($\tau_m=100$ мс, $\tau_c=4$ нс)

Оста- ток i	$I/I_0 \cdot 10^4$ кросс-пика *						
	NH_i/H_i^α	NH_i/H_i^β	NH_i/H_i^γ NH_i/H_i^δ	NH_i/NH_{i+1}	H_i^α/NH_{i+1}	H_i^β/NH_{i+1}	H_i^γ/NH_{i+1} H_i^δ/NH_{i+1}
Pro ²					926	138; 139	γ : 18; 25 δ : 8; 11
Asp ³	320	860; 352		318	77	231; 123	
Phe ⁴	251	155; 348	δ : 31; 315	296	79	33; 36	δ : 73; 22
Cys ⁵	286	619; 244		428	83	133; 62	
Leu ⁶	217	384; 173	γ : 705 δ : 114; 183	389	81	72; 39	γ : 41 δ : 14; 25
Glu ⁷	206	362; 178	γ : 395; 780	39 38	897 1167	252; 625 134; 373	γ : 89; 49 γ : 57; 33
Pro ⁸					572	556; 556	γ : 77; 60 δ : 11; 12
Pro ⁹					685	311; 332	γ : 38; 30 δ : 8; 8
Tyr ¹⁰					707	97; 104	γ : 18; 14 δ : 7; 7
Thr ¹¹	220	257; 476	δ : 27; 57	43	982	61; 37	δ : 47; 15
Thr ¹¹	226	926	γ : 135; 121	557	87	384	γ : 108; 39
Gly ¹²	594; 331			53 69	546; 570 674; 496		
Pro ¹³					63	63; 43	γ : 47; 37 δ : 169; 89
Cys ¹⁴	257	734; 284		43	668	212; 553	
Lys ¹⁵	213	448; 188	γ : 252; 127	290	177	38; 28	γ : 18; 10
Ala ¹⁶	301	805		39	384	692	
Arg ¹⁷	193	281; 124	γ : 71; 136	79	763	34; 54	γ : 47; 28
Ile ¹⁸	209	588	γ : 144; 327	37	862	32	γ : 60; 32 $C^{12}H_3$: 166 $C^{\delta}H_3$: 17
Ile ¹⁹	209	511	γ : 848; 326 $C^{12}H_3$: 94 $C^{\delta}H_3$: 92	33	714	42	γ : 21; 16 $C^{12}H_3$: 237 $C^{\delta}H_3$: 128
Arg ²⁰	172	391; 153	γ : 150; 81	32	350	195; 496	γ : 39; 43
Tyr ²¹	178	642; 245	δ : 573; 26	31	843	64; 145	δ : 41; 53
Phe ²²	180	75; 138	δ : 49; 519	24	454	211; 99	δ : 95; 9
Tyr ²³	206	441; 627	δ : 59; 42	34	895	60; 40	δ : 19; 97
Asn ²⁴	226	348; 626		39	671	54; 33	
Ala ²⁵	283	833		233	63	224	
Lys ²⁶	271	542; 231	γ : 218; 509	357	78	191; 95	γ : 24; 40
Ala ²⁷	243	732		1086	107	227	
Gly ²⁸	715; 405			342	139; 115		
Leu ²⁹	224	66; 92	γ : 412 δ : 298; 71	34	519	886; 345	γ : 44 δ : 148; 75
Cys ³⁰	185	751; 284		32	779	82; 176	
Gln ³¹	208	227; 116	γ : 76; 139	36	595	159; 470	γ : 83; 47
Thr ³²	199	71	γ : 123; 342	33	826	520	γ : 53; 138
Phe ³³	222	61; 94	δ : 43; 356	30	476	345; 144	δ : 118; 13
Val ³⁴	201	690	γ : 110; 475	42	1094	38	γ : 159; 74
Tyr ³⁵	207	448; 764	δ : 44; 94	28	591	59; 35	δ : 424; 41
Gly ³⁶	398; 733			221	101; 108		
Gly ³⁷	784; 425			435	115; 119		
Cys ³⁸	211	65; 101		37	844	330; 167	

Остаток i	$I/I_0 \cdot 10^4$ кросс-пика *						
	$\text{NH}_i/\text{H}_i^\alpha$	$\text{NH}_i/\text{H}_i^\beta$	$\text{NH}_i/\text{H}_i^\gamma$ $\text{NH}_i/\text{H}_i^\delta$	$\text{NH}_i/\text{NH}_{i+1}$	$\text{H}_i^\alpha/\text{NH}_{i+1}$	$\text{H}_i^\beta/\text{NH}_{i+1}$	$\text{H}_i^\gamma/\text{NH}_{i+1}$ $\text{H}_i^\delta/\text{NH}_{i+1}$
Arg ³⁹	969	74; 100	γ : 146; 69	301	240	24; 29	γ : 14; 8
Ala ⁴⁰	257	820		36	823	286	
Lys ⁴¹	227	901; 334	γ : 107; 188	36	273	150; 419	γ : 61; 36
Arg ⁴²	274	776; 309	γ : 158; 281	354	65	107; 59	γ : 20; 24
Asn ⁴³	244	540; 550		57	567	39; 32	
Asn ⁴⁴	232	115; 176		66	1152	60; 40	
Phe ⁴⁵	199	212; 101	δ : 312; 19	32	712	135; 351	δ : 13; 71
Lys ⁴⁶	203	483; 202	γ : 125; 281	445	82	87; 50	γ : 17; 27
Ser ⁴⁷	212	68; 107		34	685	329; 147	
Ala ⁴⁸	259	656		299	65	206	
Glu ⁴⁹	280	630; 255	γ : 104; 154	293	77	254; 116	γ : 25; 23
Asp ⁵⁰	221	687; 275		359	73	340; 181	
Cys ⁵¹	300	440; 626		334	77	112; 299	
Met ⁵²	248	617; 256	γ : 467; 208	308	74	147; 78	γ : 33; 22
Arg ⁵³	315	566; 628	γ : 83; 67	446	85	184; 447	γ : 80; 46
Thr ⁵⁴	251	532	γ : 123; 96	314	80	328	γ : 33; 88
Cys ⁵⁵	202	571; 222		725	126	100; 51	
Gly ⁵⁶		389; 712		409	121; 147		
Gly ⁵⁷		913; 473		84	576; 423		

* Подчеркнуты интенсивности кросс-пиков ЯЭО, образованных β -протонами, расположенными в ориентации *trans* относительно α -протона. Для предпролиновых остатков вместо протона NH_{i+1} учтены протоны $\text{H}_{i+1}^{\delta 2}$ и $\text{H}_{i+1}^{\delta 3}$ остатка пролина. Для ароматических колец остатков Phe и Tyr указаны интенсивности кросс-пиков, образованных только протонами H^δ , поскольку кросс-линии с участием остальных ароматических протонов имеют близкую к нулю интенсивность. Для остатков Gln, Lys, Arg, Met боковые цепи аппроксимировали фрагментом $\text{CH}_2^\beta\text{---CH}_2^\gamma\text{---C}^\delta$, и поэтому кросс-линии ЯЭО с участием δ -, ϵ - и η -протонов не учитывали. В графе для γ -протонов приведены интенсивности кросс-пиков ЯЭО, образованных метильными группами $\text{C}^\gamma\text{H}_3$ и $\text{C}^\gamma\text{H}_2$ остатков Val, а также протоном O^γH и метильной группой $\text{O}^\gamma\text{H}_3$ остатков Thr.

минимизации функции ошибок $F_{\text{ЯЭО}}(\varphi_i, \psi_i, \chi_i)$, представляющей собой среднее отклонение интенсивностей кросс-пиков ЯЭО, измеренных экспериментально ($I_k^{\text{э}}$) и рассчитанных теоретически по координатам протонов ($I_k^{\text{т}}$) для соответствующего дипептидного фрагмента молекулы (рис. 1). При этом интенсивности нормировали на среднюю интенсивность кросс-пиков ЯЭО в рассматриваемой системе протонов:

$$F_{\text{ЯЭО}} = 1/M \sum_{k=1}^M |I_k^{\text{э}} - I_k^{\text{т}}|, \quad (1)$$

где $I_k^{\text{э}} = I_k^{\text{э}} / (1/M \sum_{j=1}^M I_j^{\text{э}})$, $I_k^{\text{т}} = I_k^{\text{т}} / (1/M \sum_{j=1}^M I_j^{\text{т}})$, M — число кросс-пиков ЯЭО.

Матрицу интенсивностей кросс-пиков ЯЭО $\mathbf{I}(\tau_m)$, зависящую от времени обмена компонент намагниченности τ_m , рассчитывали с учетом взаимодействия всех протонов в системе [14–16]:

$$\mathbf{I}(\tau_m) = \exp(-\mathbf{R}\tau_m)\mathbf{I}_0 = \mathbf{D} \exp(-\mathbf{A}\tau_m)\mathbf{D}^{-1}\mathbf{I}_0, \quad (2)$$

где \mathbf{R} — матрица релаксации, \mathbf{D} — матрица собственных векторов матрицы \mathbf{R} , \mathbf{A} — диагональная матрица, содержащая собственные значения матрицы \mathbf{R} , \mathbf{I}_0 — диагональная матрица, описывающая состояние спиновой системы перед началом импульсной последовательности NOESY. В дан-

ной работе начальное состояние системы предполагалось равновесным и поэтому матрица \mathbf{I}_0 в уравнении (2) была единичной.

Действительная и симметричная матрица релаксации \mathbf{R} для системы, состоящей из N спинов, имеет вид:

$$\mathbf{R} = \begin{pmatrix} \rho_1 & \sigma_{12} & \dots & \sigma_{1N} \\ \sigma_{21} & \rho_2 & \dots & \sigma_{2N} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \sigma_{N1} & \sigma_{N2} & \dots & \rho_N \end{pmatrix}, \quad (3)$$

где ρ_i — скорость ухода намагниченности с i -го ядра, σ_{lm} — скорость кросс-релаксации между ядрами l и m .

Поскольку в интересующем нас случае белков и больших пептидов время вращательной корреляции молекул $\tau_c > 10^{-9}$ с, при рабочей частоте спектрометра $\nu_0 = 500$ МГц имеем $(\omega_0 \tau_c)^2 \gg 1$ и, следовательно, диагональные элементы матрицы \mathbf{R} (ρ_i) определяются выражением [17]

$$\rho_i = 1/T_{1i} - \sum_m \sigma_{im}, \quad (4)$$

где T_{1i} — экспериментально измеренное время продольной релаксации i -го ядра при неселективном возбуждении спиновой системы.

Скорости кросс-релаксации между неметильными протонами рассчитывали по формуле [18]

$$\sigma_{lm} = -(\gamma^4 \hbar^2 / 10 r_{lm}^6) \tau_{lm}, \quad (5)$$

где γ — гиромагнитное отношение для протонов, \hbar — постоянная Планка, r_{lm} — расстояние между протонами l и m , τ_{lm} — время корреляции движения вектора, соединяющего эти протоны. В приближении «жесткой глобулы» все времена τ_{lm} полагали равными времени корреляции вращения белковой глобулы τ_c ($\tau_{lm} = \tau_c$).

Вращение метильных групп, приводящее к эквивалентности входящих в их состав протонов, учитывали в модели быстрых скачков между дискретными состояниями в изотропно вращающейся молекуле [19]. σ_{lm} между протонами, относящимися к одной метильной группе, полагали равными нулю, а в остальных случаях скорость кросс-релаксации протонов метильной группы рассчитывали по формуле

$$\sigma_{lm} = -2\pi/5 \gamma^4 \hbar^2 \tau_c / 5 \sum_{s=-2}^2 \left[\sum_{s=1}^L \langle P_s \rangle Y_{2L}(\theta_s, \varphi_s) / r_{lms}^3 \right]^2, \quad (6)$$

где $L=3$, $\langle P_s \rangle = 1/3$ для взаимодействия неметильного протона с метильным, $L=9$, $\langle P_s \rangle = 1/9$ для взаимодействия протонов, принадлежащих двум метильным группам (L — число дискретных состояний системы, $\langle P_s \rangle$ — их вероятность), r_{lms} — расстояние между протонами в s -м состоянии метильных групп, Y_{2L} — сферические функции, θ_s и φ_s — полярные углы, характеризующие направление вектора r_{lms} .

Таким образом, интенсивности кросс-пигов ЯЭО для спектра NOESY с заданным значением τ_m можно рассчитать по координатам протонов, временам их спин-решеточной релаксации $T_1 = T_{1i}$ и времени корреляции вращения глобулы τ_c . Времена T_1 нужно предварительно измерить в одномерных или двумерных ^1H -ЯМР-спектрах [10, 20], а время τ_c измерить с помощью спектроскопии ^{13}C -ЯМР [13] или оценить, исходя из размеров белковой глобулы. Времена T_1 входят только в диагональные элементы матрицы \mathbf{R} (уравнение (4)), и поэтому ошибка в их измерении незначительно сказывается на интенсивностях кросс-пигов ЯЭО (в работе [5] показано, что ошибка в T_1 в два раза приводит к изменению интенсивностей не более чем на 20%). Поэтому для T_1 можно использовать приближенные значения, характерные для различных типов протонов (амидных, ароматических, метильных, H^α , H^β и т. д.) [5].

Основное упрощение при использовании уравнений (2–5) заключается в том, что принимается во внимание лишь вращение метильных групп, а остальные виды внутримолекулярной подвижности белка не учитываются. Используя модель «жесткой глобулы» можно рассматривать как первое приближение при расчете пространственной структуры и вносить необходимые коррективы, если возникнут противоречия с экспериментальными данными. В частности, ситуация, когда в растворе одновременно реализуется несколько быстро (в шкале времени ЯМР) переходящих друг в друга конформаций, должна проявляться по наличию противоречивой системы кросс-пиков ЯЭО, которые не могут одновременно удовлетворяться в одной низкоэнергетической информации. В рамках рассмотренной модели (уравнения (1–6)) повышенная подвижность дипептидного фрагмента может привести: 1) к аномально высокой величине $F_{\text{ЯЭО}}$ для всех рассмотренных конформаций фрагмента, 2) к наличию нескольких конформаций, эквивалентных по величине $F_{\text{ЯЭО}}$, 3) к тому, что минимум $F_{\text{ЯЭО}}$ будет соответствовать стерически запрещенной конформации, 4) к отличию эффективного времени корреляции τ_c , полученного при минимизации $F_{\text{ЯЭО}}$ (см. ниже) для данного дипептидного фрагмента, от τ_c , полученного для большинства других фрагментов молекулы. Следует отметить, что модель «жесткой глобулы» должна давать хорошие результаты, если подвижность ограничена лишь быстрыми колебательными движениями атомов в окрестности одной конформации молекулы, поскольку показано, что динамически усредненные величины элементов матрицы релаксации \mathbf{R} в этом случае близки к значениям, рассчитанным исходя из средних расстояний между протонами [21].

При использовании реальных спектров NOESY помимо внутримолекулярной подвижности могут проявиться и другие факторы, не рассмотренные в модельном расчете. Это прежде всего погрешность измерения объемов кросс-пиков ЯЭО и неполнота экспериментальной информации из-за перекрытия кросс-пиков в спектрах NOESY. Влияние этих факторов на результаты анализа локальной структуры, очевидно, будет индивидуальным для каждого конкретного белка.

Влияние окружения дипептидного фрагмента в белке на интенсивности кросс-пиков ЯЭО и функцию ошибок $F_{\text{ЯЭО}}$. Интенсивность кросс-пика ЯЭО между протонами А и В дипептидного фрагмента может значительно измениться под воздействием протона Х, удаленного от А и В в пептидной цепи, но сближенного с ними в пространстве [5]. При этом следует рассматривать два процесса: уход намагниченности с протонов А и В на протон Х и спиновую диффузию по пути $A \rightleftharpoons X \rightleftharpoons B$ [5]. Первый процесс приводит к уменьшению интенсивности кросс-пика ЯЭО в белке по сравнению с изолированным фрагментом и эффективен при условии, что протон Х сближен хотя бы с одним из протонов А и В. Второй процесс (спиновая диффузия), наоборот, вызывает увеличение интенсивности, которое может быть значительным, если протоны А и В удалены друг от друга на расстояние свыше 3–3,5 Å, но оба сближены с протоном Х [5].

Каждый дипептидный фрагмент окружен протонами белка, забирающими намагниченность (чаще всего это протоны H^α и NH соседних в аминокислотной последовательности остатков). Однако мала вероятность того, чтобы один из окружающих протонов «внедрился» в дипептидный фрагмент и оказался тесно сближенным одновременно с двумя его протонами, удаленными один от другого. В частности, результаты расчета для ВРТИ показали, что спиновая диффузия по пути $A \rightleftharpoons X \rightleftharpoons B$ оказывается значительной, лишь когда Х и А или Х и В — геминальные протоны, принадлежащие одному дипептидному фрагменту. Например, как для изолированного дипептидного фрагмента Asp^{50} (рис. 2б), так и с учетом других протонов ВРТИ (рис. 2а) интенсивность кросс-пиков $\text{NH}_i/\text{H}_i^{\beta 3}$ ($r=3,6$ Å) и $\text{H}_i^{\beta 3}/\text{NH}_{i+1}$ ($r=3,3$ Å) в несколько раз больше, чем следовало бы ожидать, исходя только из соответствующих межпротонных расстояний. Это объясняется спиновой диффузией по путям

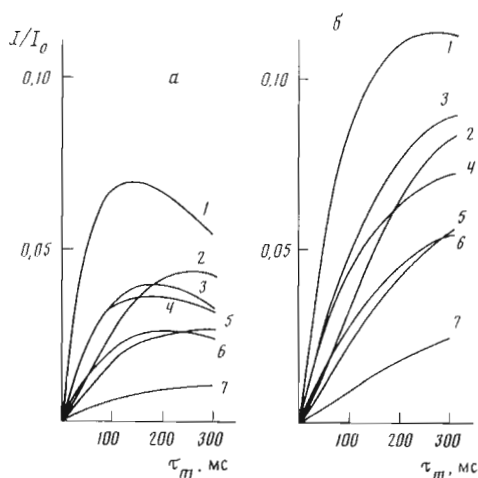


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость относительных интенсивностей (I/I_0) кросс-пиков ЯЭО, вычисленных по уравнениям (2–6), от времени обмена компонент намагниченности τ_m для дипептидного фрагмента Asp³⁰ в составе молекулы ВРТИ (а) и для изолированного дипептидного фрагмента (б). В обоих случаях использованы одни и те же координаты протонов, времена T_1 и τ_c . Интенсивности приведены для следующих кросс-пиков: 1 – $\text{NH}_i/\text{NH}_i^{\beta 2}$ (расстояние между протонами 2,3 Å); 2 – $\text{NH}_i/\text{NH}_i^{\beta 3}$ (3,6 Å); 3 – $\text{NH}_i/\text{NH}_{i+1}$ (2,6 Å); 4 – $\text{H}_i^{\beta 2}/\text{NH}_{i+1}$ (2,6 Å); 5 – $\text{H}_i^{\beta 3}/\text{NH}_{i+1}$ (2,3 Å); 6 – $\text{NH}_i/\text{NH}_i^{\alpha}$ (2,9 Å); 7 – $\text{H}_i^{\alpha}/\text{NH}_{i+1}$ (3,6 Å)

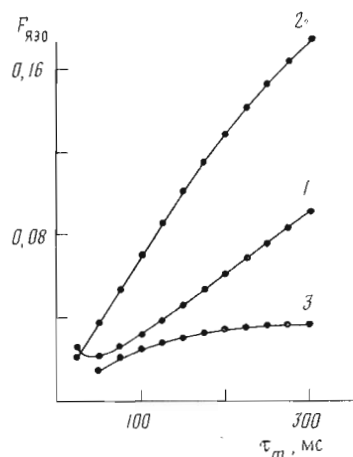


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость $F_{\text{ЯЭО}}$ от τ_m , вычисленная при кристаллографических координатах атомов для дипептидных фрагментов Lys¹⁵ (1), Asn³⁴ (2) и Gly³⁷ (3)

$\text{NH}_i \rightleftharpoons \text{H}_i^{\beta 2} \rightleftharpoons \text{H}_i^{\beta 3}$ и $\text{NH}_{i+1} \rightleftharpoons \text{H}_i^{\beta 2} \rightleftharpoons \text{H}_i^{\beta 3}$. Из-за малого расстояния между гемминальными протонами диффузия эффективна даже при коротких временах $\tau_m=50$ мс. Аналогичным образом спиновая диффузия эффективна по путям $\text{NH}_i(\text{NH}_{i+1}) \rightleftharpoons \text{H}^{\beta} \rightleftharpoons \text{C}^{\delta} \text{H}_3$ для остатков Leu и Ile и $\text{NH}_i(\text{NH}_{i+1}) \rightleftharpoons \text{H}^{\beta} \rightleftharpoons \text{C}^{\delta} \text{H}_3$ для остатков Val, Thr и Ile. Таким образом, спиновая диффузия в первую очередь существенна внутри дипептидных фрагментов.

Интенсивности кросс-пиков ЯЭО, рассчитанные для дипептидных фрагментов, оказываются систематически завышенными по сравнению с интенсивностями в целой молекуле ВРТИ (рис. 2), поскольку не учитывается уход намагниченности на окружающие протоны белка. Нормировка интенсивностей на их сумму при вычислении функции $F_{\text{ЯЭО}}$ (уравнение (1)) сильно уменьшает систематическую ошибку в интенсивностях кросс-пиков, обусловленную выделением дипептидного фрагмента из состава целой молекулы. Поэтому величина $F_{\text{ЯЭО}}$ оказывается незначительной. В среднем для дипептидных фрагментов ВРТИ при $\tau_m=100$ мс она составляет 0,035 и не превышает 0,07 (см. значения $F_{\text{ЯЭО}}^0$ в табл. 2). Таким образом, средняя ошибка в вычислении интенсивностей составляет не более 7% от средней интенсивности кросс-пиков ЯЭО в дипептидном фрагменте. Следует подчеркнуть, что речь здесь идет о вкладе в $F_{\text{ЯЭО}}$, обусловленном только влиянием окружения дипептидного фрагмента в белке, так как необходимые для вычисления этого вклада экспериментальные и теоретические интенсивности кросс-пиков ЯЭО рассчитывали по уравнениям (2–6) на основе одних и тех же координат протонов и времен T_1 и τ_c .

Функция $F_{\text{ЯЭО}}$ возрастает с увеличением времени обмена компонент намагниченности τ_m , поскольку усиливается передача намагниченности на окружающие протоны (рис. 3). В рассмотренном диапазоне τ_m (0,025–0,3 с) зависимость $F_{\text{ЯЭО}}(\tau_m)$ почти для всех остатков ВРТИ хорошо аппроксимируется линейным уравнением $F_{\text{ЯЭО}}=a+k\tau_m$ (коэффициент корреляции ρ меньше 0,98 лишь для дипептидных фрагментов Pro⁹ и Gly³⁷). Коэффициент k в среднем составляет 0,35 с⁻¹ и максимален

Торсионные углы основной цепи φ и ψ и соответствующие им значения штрафной функции, полученные при модельном расчете локальной структуры ВРТИ *

i-й остаток	$\varphi_i^{\min}(\Delta\varphi_i)^{2*}$, град	$\psi_i^{\min}(\Delta\psi_i)^{2*}$, град	$F_{\text{ЯЭО}}^{\min} \cdot 100^{3*}$ для ротамеров:			$F_{\text{ЯЭО}}^0 \cdot 100$
			g+	g-	t	
Pro ²		149(0)	2			1
Asp ³	-52(6)	-36(-3)	2	5	8	4
Phe ⁴	-71(8)	1(17)	12	6	44	4
Cys ⁵	-60(10)	-25(-6)	1	6	9	3
Leu ⁶	-76(13)	-1(2)	3	10	55	6
Gln ⁷	-103(-30)	147(-3)	3	3	71	3
Pro ⁸		170(12)	7			3
Pro ⁹		148(5)	2			0
Tyr ¹⁰	-133(-12)	97(-18)	8	14	2	3
Thr ¹¹	-81(-4)	-49(-13)	1	61	25	4
Gly ¹²	134(44)	174(-2)	3			3
Pro ¹³		-23(-13)	7			5
Cys ¹⁴	-103(-11)	166(7)	0	5	21	2
Lys ¹⁵	-103(16)	30(-2)	2	8	28	3
Ala ¹⁶	-49(28)	178(5)	1			0
Arg ¹⁷	-136(-6)	88(7)	3	49	13	5
Ile ¹⁸	-83(-26)	122(14)	2	47	36	2
Ile ¹⁹	-57(21)	137(17)	12 ^{4*}	40	76	3
Arg ²⁰	-106(16)	172(-7)	3	13	65	3
Tyr ²¹	-104(10)	144(-3)	1	3	35	3
Phe ²²	-117(13)	161(1)	12	6	52	4
Tyr ²³	-94(-7)	137(10)	15	15	2	2
Asn ²⁴	-84(16)	89(-8)	10	9	5	4
Ala ²⁵	-48(11)	-40(-12)	0			5
Lys ²⁶	-61(-9)	-38(-3)	3	16	44	6
Ala ²⁷	-91(-1)	-41(9)	4			5
Gly ²⁸	63(-16)	18(5)	2			3
Leu ²⁹	-168(-12)	176(-5)	19	9	54	3
Cys ³⁰	-92(3)	147(1)	2	6	7	2
Gln ³¹	-144(13)	165(4)	4	19	56	6
Thr ³²	-125(-36)	162(6)	59	6	44	3
Phe ³³	-173(-22)	168(4)	9	2	46	5
Val ³⁴	-94(3)	113(0)	42	4	1	7
Tyr ³⁵	-77(9)	157(22)	21	13	5	3
Gly ³⁶	-60(19)	5(14)	1			3
Gly ³⁷	78(-24)	-1(-8)	2			2
Cys ³⁸	-141(5)	150(-7)	10	4	32	3
Arg ³⁹	47(-15)	35(-1)	19 ^{4*}	12	16	5
Ala ⁴⁰	-74(-18)	150(-6)	0			5
Lys ⁴¹	-65(39)	171(-1)	13	13	43	3
Arg ⁴²	-57(16)	-21(5)	3	9	22	4
Asn ⁴³	-78(4)	71(-3)	25	26	5	1
Asn ⁴⁴	-163(0)	117(15)	8	9	4	5
Phe ⁴⁵	-160(-37)	161(7)	6	8	51	6
Lys ⁴⁶	-73(13)	-23(-15)	1	10	30	4
Ser ⁴⁷	-145(6)	157(-1)	6	0	31	2

i-й остаток	$\varphi_i^{\min}(\Delta\varphi_i)^{2*}$, град	$\psi_i^{\min}(\Delta\psi_i)^{2*}$, град	$F_{\text{ЯЭО}}^{\min} \cdot 100^{3*}$ для ротамеров			$F_{\text{ЯЭО}}^0 \cdot 100$
			g^+	g^-	t	
Ala ⁴⁸	-56 (9)	-34 (-4)	1			4
Glu ⁴⁹	-69 (2)	-51 (-12)	$\frac{10}{1}^{4*}$	29	19	5
Asp ⁵⁰	-70 (0)	-50 (-12)	$\frac{1}{1}$	13	7	3
Cys ⁵¹	-59 (3)	-50 (-5)	20	24	$\frac{1}{1}$	5
Met ⁵²	-55 (17)	-32 (-3)	$\frac{2}{1}$	12	43	5
Arg ⁵³	-67 (-5)	-51 (-13)	27	49	$\frac{1}{1}$	4
Thr ⁵⁴	-60 (22)	-44 (-2)	$\frac{4}{1}$	66	39	4
Cys ⁵⁵	-82 (29)	-11 (-3)	$\frac{3}{1}$	7	4	2
Gly ⁵⁶	-68 (8)	-22 (-16)	$\frac{2}{1}$			3
Gly ⁵⁷	72 (-12)	168 (0)	1			0

* Углы φ_i^{\min} и ψ_i^{\min} соответствуют глобальному минимуму функции $F_{\text{ЯЭО}}(\varphi_i, \psi_i, \chi_i^1)$ для i -го дипептидного фрагмента ВРТИ. В скобках указано отклонение величин $\varphi_i^{\min}(\Delta\varphi_i)$ и $\psi_i^{\min}(\Delta\psi_i)$, полученных при модельном расчете, от торсионных углов φ_i^0, ψ_i^0 кристаллографической структуры ВРТИ [10, 11]: $\Delta\varphi_i = \varphi_i^{\min} - \varphi_i^0$ и $\Delta\psi_i = \psi_i^{\min} - \psi_i^0$. $F_{\text{ЯЭО}}^{\min}$ — наименьшая величина штрафной функции, полученная для трех ротамеров: g^+ ($\chi^1 = -60 \pm 30^\circ$), g^- ($60 \pm 30^\circ$) и t ($180 \pm 30^\circ$). $F_{\text{ЯЭО}}^0$ — величина штрафной функции, обусловленная влиянием протонов окружения дипептидного фрагмента в белке на интенсивности кросс-пиков ЯЭО, т. е. рассчитанная при использовании для каждого дипептидного фрагмента координат протонов, реконструированных по кристаллографической структуре ВРТИ.

^{2*} В случае остатков глицина углы φ_i^{\min} и ψ_i^{\min} приведены для одного из двух минимумов, симметричных относительно точки $\varphi_i = 0, \psi_i = 0$.

^{3*} Величина $F_{\text{ЯЭО}}^{\min}$ подчеркнута для ротамера, реализующегося в кристаллографической конформации ВРТИ.

^{4*} Для всех остатков, кроме ароматических и лейцина, при минимизации $F_{\text{ЯЭО}}$ начальное значение угла $\chi^2 = 180^\circ$ (см. «Экспериментальную часть»). Величина $F_{\text{ЯЭО}}^{\min}$ указанного ротамера незначительно (в пределах 0,1) увеличена из-за того, что правильное значение χ^2 (-60 или 60°), реализующееся в кристаллографической конформации остатка, не было достигнуто в процессе минимизации $F_{\text{ЯЭО}}$. В случае дипептидного фрагмента Arg⁵³ при правильном значении χ^2 (-60°) величина $F_{\text{ЯЭО}}^{\min}$ минимальна для ротамера g^+ и составляет 0,03.

для остатка Asp³⁴. Очевидно, что величина коэффициента k зависит от ближайшего окружения остатка в белке. При этом нам не удалось обнаружить какой-либо корреляции коэффициента k с конформацией остатка или с его присутствием в том или ином элементе регулярной вторичной структуры.

Зная зависимость $F_{\text{ЯЭО}}$ от τ_m , можно оценить диапазон значений τ_m , пригодный для анализа локальной структуры белка. Обычно спектры NOESY стараются снимать при коротких временах τ_m (50–75 мс), чтобы свести к минимуму спиновую диффузию. Однако при уменьшении τ_m интенсивности кросс-пиков ЯЭО резко ослабевают (рис. 2а), падает отношение сигнал/шум в спектре NOESY и в результате заметно сокращается число наблюдаемых кросс-пиков, т. е. происходит потеря значительной части экспериментальной информации. Интенсивности кросс-пиков ЯЭО между протонами, сближенными на расстояние 2–3 Å, максималны при $\tau_m = 100$ –200 мс (рис. 2а) в диапазоне времен корреляции τ_c 1–16 нс [5]. Интервал значений τ_m 100–200 мс пригоден и для расчета локальной структуры, поскольку величина $F_{\text{ЯЭО}}$ здесь невелика (не более 0,13 при 200 мс). В дальнейшем при модельном поиске локальной структуры ВРТИ в качестве компромисса использовалось $\tau_m = 100$ мс, удобное для измерения интенсивностей и обеспечивающее меньшую, чем при 200 мс, величину $F_{\text{ЯЭО}}$.

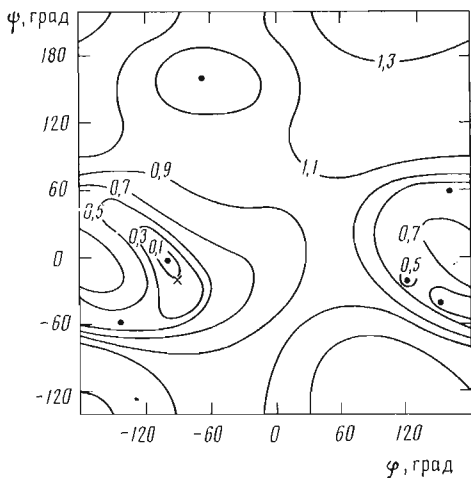


Рис. 4

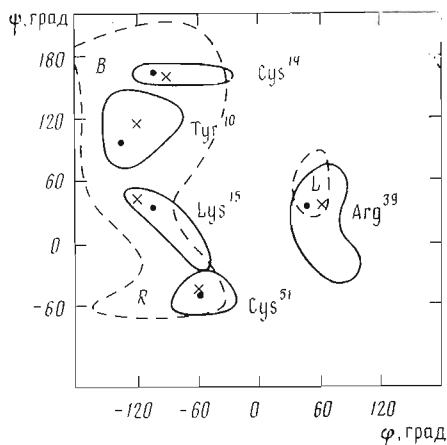


Рис. 5

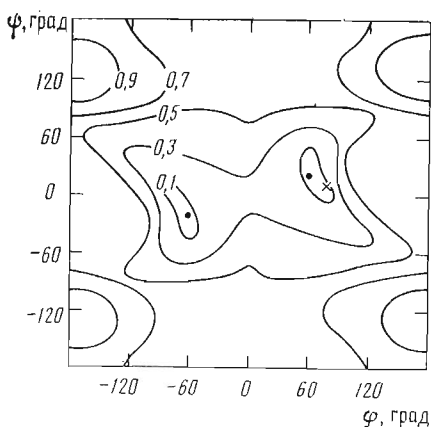


Рис. 6

Рис. 4. Карта $F_{яэ0}(\varphi_i, \psi_i)$ для дипептидного фрагмента Ala^{27} , имеющего идеализированную геометрию. Здесь и далее на рис. 5–7, 12, 13 и 16 точки обозначены локальные минимумы функции $F_{яэ0}$, а крестик соответствует кристаллографической конформации остатка

Рис. 5. Области малых значений $F_{яэ0}$ для дипептидных фрагментов Tyr^{10} , Cys^{14} , Lys^{15} , Arg^{39} и Cys^{51} ВРТИ. Проведены изолинии $F_{яэ0} = F_{яэ0}^{\min} + 0,2$, где $F_{яэ0}^{\min}$ — глобальный минимум штрафной функции. Штриховыми линиями ограничены низкоэнергетические области R, B и L для дипептидного фрагмента аланина

Рис. 6. Карта $F_{яэ0}(\varphi_i, \psi_i)$ для дипептидного фрагмента Gly^{28} . Обозначения как на рис. 4

Модельный расчет локальной структуры ВРТИ проводили на основе интенсивностей кросс-пиков ЯЭО, вычисленных для кристаллографической структуры молекулы (табл. 1). Для каждого дипептидного фрагмента ВРТИ строили поверхности $F_{яэ0}(\varphi_i, \psi_i)$, определяли торсионные углы φ_i и ψ_i , соответствующие минимуму $F_{яэ0}(\varphi_i^{m,n}$ и $\psi_i^{m,n}$ в табл. 2), и оценивали возможность реализации ротамеров боковой цепи путем сравнения найденных для них наименьших значений $F_{яэ0}$ ($F_{яэ0}^{\min}$ в табл. 2).

Построение поверхностей $F_{яэ0}(\varphi_i, \psi_i)$ показало, что все дипептидные фрагменты ВРТИ, кроме глицина, имеют только одну область, в пределах которой функция $F_{яэ0}$ мала и где расположен ее глобальный минимум (рис. 4 и 5). При этом поверхность может включать несколько дополнительных локальных минимумов, характеризующихся существенно большей величиной функции, чем глобальный минимум (рис. 4). Таким образом, торсионные углы основной цепи φ_i и ψ_i определяются однозначно. Для остатков глицина поверхность $F_{яэ0}(\varphi_i, \psi_i)$ симметрична относительно точки $\varphi_i=0, \psi_i=0$, и поэтому имеют два равнозначных минимума (рис. 6).

Построение зависимостей $F_{яэ0}(\varphi_i, \psi_i)$ позволяет ввести ограничения на углы φ_i и ψ_i , необходимые для дальнейшего расчета пространственной структуры белка с помощью алгоритма DISMAN [8] или какого-либо другого метода. Диапазон значений φ_i, ψ_i можно ограничить областью конформационной карты, в пределах которой, во-первых, $F_{яэ0}$ меньше некоторой заданной величины, во-вторых, не нарушаются стерические ограничения и, в-третьих, угол φ соответствует экспериментальному зна-

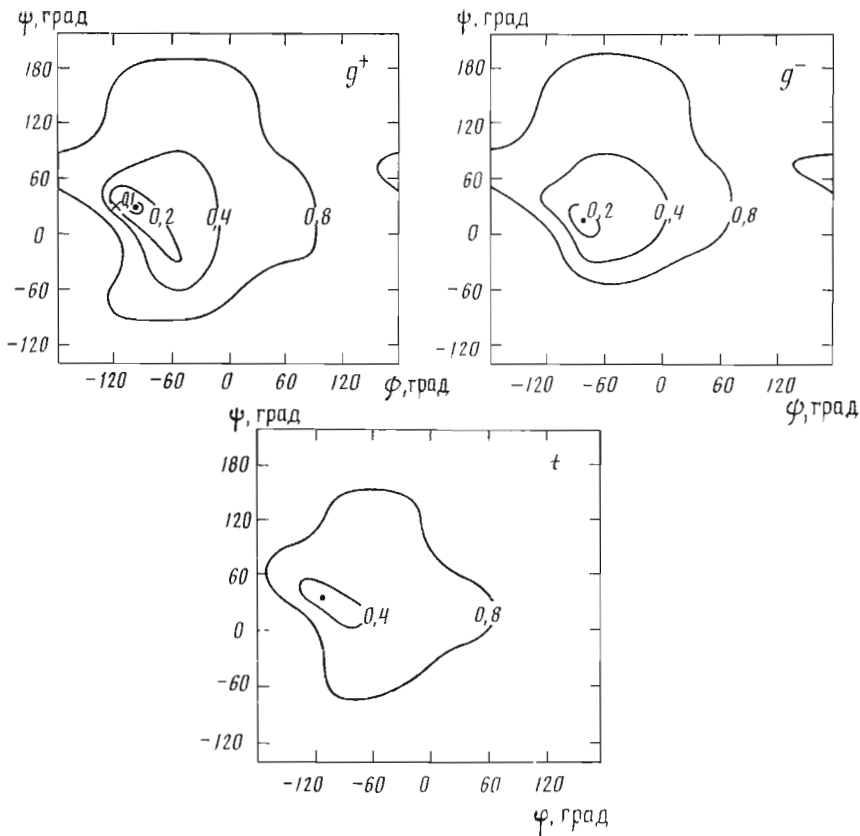


Рис. 7. Карты $F_{\text{ЯЭО}}(\varphi, \psi)$ дипептидного фрагмента Lys^{15} для ротамеров боковой цепи g^+ , g^- и t (торсионный угол $\chi^1 = -60 \pm 30$, 60 ± 30 и $180 \pm 30^\circ$ соответственно). Наименьшие значения $F_{\text{ЯЭО}}$ ($F_{\text{ЯЭО}}^{\text{min}}$) для ротамеров g^+ , g^- и t равны соответственно 0,02; 0,08 и 0,28. Ротамер g^+ соответствует кристаллографической конформации остатка. Обозначения как на рис. 4

чению константы спин-спинового взаимодействия (КССВ) протонов $\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H}$ ($J_{\text{N}\alpha}$) [22]. Например, для остатков Tyr^{10} , Cys^{14} , Lys^{15} , Arg^{39} и Cys^{54} достаточно рассмотреть пересечение приведенных на рис. 5 областей, характеризующихся малой величиной $F_{\text{ЯЭО}}$, и низкоэнергетических областей R , B и L , а величину угла φ этих остатков можно ограничить, используя КССВ $J_{\text{N}\alpha}$.

Торсионные углы φ_i^{min} , ψ_i^{min} , соответствующие минимуму $F_{\text{ЯЭО}}$, и φ_i^0 , ψ_i^0 , реализующиеся в кристаллографической структуре ВРТИ, незначительно отличаются друг от друга (см. табл. 2, рис. 4–7). Среднеквадратичное отклонение φ_i^{min} и ψ_i^{min} от φ_i^0 и ψ_i^0 при $\tau_m = 100$ мс составляет соответственно 18 и 9° . Отклонения торсионных углов в основном обусловлены тем, что при расчете локальной структуры для дипептидных фрагментов использованы стандартные геометрические параметры (валентные углы, длины связей и углы $\omega = 180^\circ$), отличающиеся от существующих в кристаллографической структуре ВРТИ. Ситуацию поясняет рис. 8. Величина $F_{\text{ЯЭО}}$ в конформации A , соответствующей кристаллографической структуре белка ($F_{\text{ЯЭО}}^0$ в табл. 2), для дипептидных фрагментов ВРТИ в среднем составляет 0,035 и обусловлена обсуждавшимся выше влиянием окружения дипептидного фрагмента в белке на интенсивности кросс-пиков ЯЭО. Стандартизация геометрии при неизменных торсионных углах (переход $A \rightarrow B$ на рис. 8) приводит к изменению межпротоновых расстояний и, как следствие, к заметному увеличению $F_{\text{ЯЭО}}$ (в среднем на 0,16). Среднеквадратичное отклонение межпротоновых расстояний σ для структур A и B , усредненное по всем дипептидным фрагментам

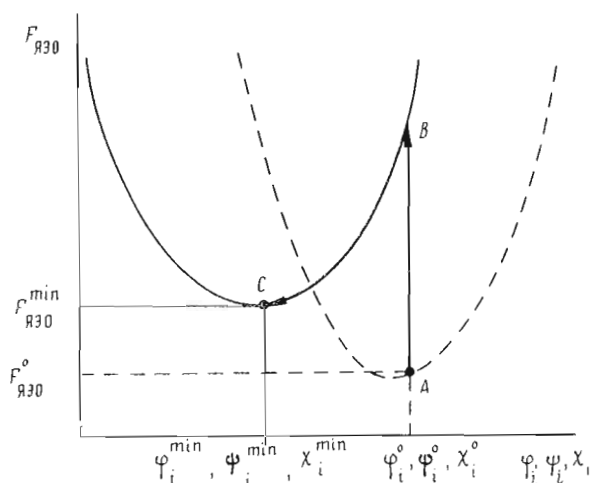


Рис. 8. Схематическое изображение функций $F_{\text{ЯЭ0}}(\varphi_i, \psi_i, \chi_i)$ для дипептидного фрагмента с кристаллографическими (штриховая линия) и стандартными (сплошная линия) значениями валентных углов, длин связей и торсионного угла ω пептидных групп. $\varphi_i^0, \psi_i^0, \chi_i^0$ — значения торсионных углов, соответствующие кристаллографической структуре (A) дипептидного фрагмента, а $\varphi_i^{\min}, \psi_i^{\min}, \chi_i^{\min}$ — минимуму функции $F_{\text{ЯЭ0}}$ для дипептидного фрагмента, имеющего стандартную геометрию (C)

ВРТИ ($\overline{\sigma r}$), составляет $0,23 \text{ \AA}^*$. Минимизация $F_{\text{ЯЭ0}}$ (переход $B \rightarrow C$) позволяет получить конформацию C, которая отличается от кристаллографической (A) значениями торсионных углов, но имеет близкие к ней межпротонные расстояния и интенсивности кросс-пиков ЯЭО. Величина функции $F_{\text{ЯЭ0}}$ в исходной (A) и результирующей (C) конформациях ($F_{\text{ЯЭ0}}^0$ и $F_{\text{ЯЭ0}}^{\min}$ соответственно) может несколько отличаться для конкретных дипептидных фрагментов ВРТИ (см. табл. 2), но в среднем почти одинакова. Средняя величина отклонения межпротонных расстояний σr для структур A и C составляет всего $0,08 \text{ \AA}$, а отклонение индивидуальных расстояний обычно не превышает $0,2 \text{ \AA}$ (рис. 9).

Полученные отклонения расстояний в расчетной и кристаллографической конформациях дипептидных фрагментов ($\overline{\sigma r} = 0,08 \text{ \AA}$) лишь частично обусловлены стандартизацией геометрических параметров. Помимо этого может сказываться влияние окружения дипептидного фрагмента на интенсивности его кросс-пиков. Величина σr , полученная при непосредственной подгонке всех межпротонных расстояний (минимизации σr для каждого дипептидного фрагмента), составляет $0,05 \text{ \AA}$, т. е. несколько меньше, чем при подгонке интенсивностей кросс-пиков ЯЭО.

В дальнейшем влияние идеализации геометрии можно исключить, используя для оценки погрешности расчета в качестве «эталоны» не саму кристаллографическую структуру ВРТИ, а конформации дипептидных фрагментов ВРТИ, полученные путем подгонки межпротонных расстояний под эту структуру. В частности, среднеквадратичное отклонение межпротонных расстояний σr для конформаций, полученных при минимизации $F_{\text{ЯЭ0}}$, от таких «эталонных» (т. е. характеризующихся наименьшей величиной σr при сравнении с кристаллографической структурой) конформа-

* $\overline{\sigma r} = 1/M \sum_{i=1}^M \sigma r_i$, где M — число дипептидных фрагментов, а σr_i — среднеквадратичное отклонение расстояний r_{lm} между структурами A и B для i -го фрагмента: $\sigma r_i = \left[1/N \sum_{l,m} (r_{lm}^A - r_{lm}^B)^2 \right]^{1/2}$ (N — число межпротонных расстояний в каждой из структур).

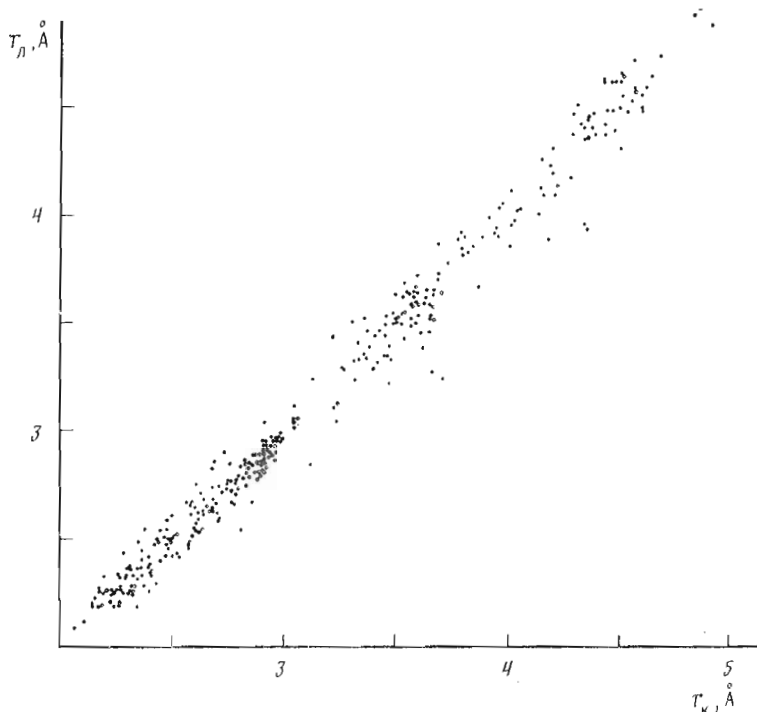


Рис. 9. Корреляция расстояний между протонами NH, H^α и H^β дипептидных фрагментов в кристаллографической структуре ВРТИ (r_k) и в конформациях дипептидных фрагментов, полученных при модельном расчете локальной структуры (r_l)

ций составляет 0,06 Å, а торсионных углов — 15° для ϕ и 8° для ψ (см. $\sigma\phi$ и $\sigma\psi$ в табл. 3 при $\tau_c = 4$ нс).

Для боковых цепей при модельном расчете локальной структуры оценивали возможность реализации одного из трех ротамеров — g^+ , g^- и t , характеризующихся величиной угла χ^1 , близкой соответственно к —60, 60 и 180°. Основное внимание уделяли именно углу χ^1 (а не χ^2 , χ^3 и т. д.), поскольку от него зависят ориентация всей боковой цепи и расстояния от протонов NH до β - и γ -протонов, существенные для определения углов основной цепи ϕ и ψ .

Ротамеры боковой цепи обычно отличаются величиной $F_{\text{ЯЭО}}^{\text{min}}$ (см. табл. 2), но соответствующие им поверхности $F_{\text{ЯЭО}}(\phi_i, \psi_i)$ близки по форме и положению минимумов (рис. 7). При модельном расчете ротамер, соответствующий кристаллографической структуре ВРТИ, всегда характеризуется наименьшей величиной $F_{\text{ЯЭО}}^{\text{min}}$ (см. табл. 2). Однако иногда (например, для Glu⁷ и Lys⁴¹) несколько ротамеров имеют очень близкие величины $F_{\text{ЯЭО}}^{\text{in}}$ и среди них нельзя с уверенностью идентифицировать реализующийся ротамер. При работе с реальными экспериментальными данными, очевидно, нужно задаться некоторым критерием $\Delta F_{\text{ЯЭО}}$ с тем, чтобы провести отбор ротамеров, для которых $F_{\text{ЯЭО}}^{\text{min}} < \min \{F_{\text{ЯЭО}}^{\text{min}}(t), F_{\text{ЯЭО}}^{\text{min}}(g^+), F_{\text{ЯЭО}}^{\text{min}}(g^-)\} + \Delta F_{\text{ЯЭО}}$. Величина $\Delta F_{\text{ЯЭО}}$ должна подбираться эмпирически, поскольку она может зависеть от соотношения сигнал/шум в спектре NOESY, времен τ_m и τ_c и других факторов. Если выбрать достаточно большой интервал $\Delta F_{\text{ЯЭО}}$ (например, 0,2), заведомо превышающий величину $F_{\text{ЯЭО}}^{\text{min}}$ для всех дипептидных фрагментов ВРТИ (см. табл. 2), то ротамер однозначно определится всего лишь для 17% аминокислотных остатков ВРТИ, а в остальных случаях величину угла χ^1 установить не удастся, поскольку два или даже все три ротамера удовлетворяют этому критерию (см. табл. 2). Таким образом, конформации боковых цепей определяются хуже, чем основной цепи, где при том же интервале $\Delta F_{\text{ЯЭО}} = 0,2$ для углов ϕ_i и ψ_i существует единственная область решения.

Влияние ошибки во времени корреляции τ_c^* на результаты определения торсионных углов основной цепи φ и ψ и штрафную функцию $F_{\text{ЯЭО}}^{\text{min}}$, полученную при модельном расчете локальной структуры ВРТИ

τ_c , нс или модель	$\sigma\varphi^{2*}$, град	$\sigma\psi^{2*}$, град	$\Delta\varphi_i^{2*}$, град		$\Delta\psi_i^{2*}$, град		$\Delta F_{\text{ЯЭО}}^{\text{min}3*}$	
			среднее	максимальное	среднее	максимальное	среднее	максимальное
2	18	11	7	42	5	32	0,06	0,12
4	15	8	0	0	0	0	0	0
8	16	13	6	32	10	35	0,09	0,28
« $1/r^6$ »	22	18	14	104	12	66	0,15	0,35

* При моделировании экспериментальных интенсивностей кросс-пиков ЯЭО ВРТИ использовали $\tau_c = 4$ нс, а для расчета локальной структуры — измененное в два раза τ_c (2 и 8 нс) или модель « $1/r^6$ ».

^{2*} $\sigma\varphi$ и $\sigma\psi$ — погрешность определения углов φ и ψ при расчете локальной структуры — вычислялась как среднеквадратичное отклонение углов φ_i^{min} и ψ_i^{min} , полученных при минимизации $F_{\text{ЯЭО}}$, от углов φ_i^r и ψ_i^r в «эталонных» конформациях дипептидных фрагментов, полученных при минимизации отклонения межпротонных расстояний в дипептидном фрагменте от расстояний в кристаллографической структуре ВРТИ:

$$\sigma\varphi(\tau_c) = [1/M \sum_{i=1}^M (\varphi_i^{\text{min}}(\tau_c) - \varphi_i^r)^2]^{1/2}, \quad \sigma\psi(\tau_c) = [1/M \sum_{i=1}^M (\psi_i^{\text{min}}(\tau_c) - \psi_i^r)^2]^{1/2}, \quad \text{где}$$

$\varphi_i^{\text{min}}(\tau_c)$, $\psi_i^{\text{min}}(\tau_c)$ — торсионные углы в глобальном минимуме функции $F_{\text{ЯЭО}}(\varphi_i, \psi_i, \chi_i)$ для i -го дипептидного фрагмента ВРТИ при одном из значений τ_c или при использовании модели « $1/r^6$ » (уравнение (7)), а M — число дипептидных фрагментов ВРТИ.

^{3*} $\Delta\varphi$, $\Delta\psi$ — изменение торсионных углов, а $\Delta F_{\text{ЯЭО}}^{\text{min}}$ — увеличение штрафной функции при появлении ошибки во времени τ_c или при переходе к модели « $1/r^6$ »:

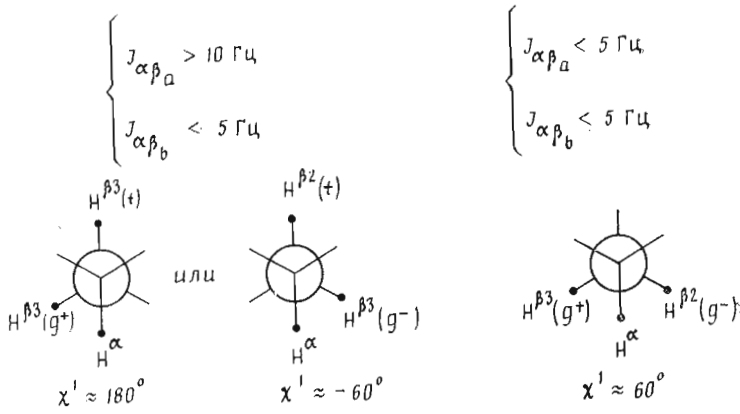
$$\Delta\varphi_i = |\varphi_i^{\text{min}}(\tau_c = 4 \text{ нс}) - \varphi_i^{\text{min}}(\tau_c)|; \quad \Delta\psi_i = |\psi_i^{\text{min}}(\tau_c = 4 \text{ нс}) - \psi_i^{\text{min}}(\tau_c)|;$$

$$\Delta F_{\text{ЯЭО}}^{\text{min}} = F_{\text{ЯЭО}}^{\text{min}}(\tau_c) - F_{\text{ЯЭО}}^{\text{min}}(\tau_c = 4 \text{ нс}).$$

Для уточнения конформации боковой цепи можно использовать КССВ протонов $\text{H}-\text{C}^\alpha\text{C}^\beta-\text{H}$ ($J_{\alpha\beta}$) [22]. Величина КССВ, меньшая 5 или большая 10 Гц, свидетельствует соответственно о *gauche*- или *trans*-ориентации α - и β -протонов. В этом случае число ротамеров можно ограничить, воспользовавшись правилами, суммированными на рис. 10. Если же наблюдаются значения КССВ, промежуточные между 5 и 10 Гц, то это указывает на динамическое усреднение нескольких конформаций либо на «скошенность» реализующегося ротамера боковой цепи, т. е. существенное отличие угла χ^1 от стандартных значений — 60, 60 и 180°. В этом случае определение конформаций боковой цепи затруднено. При модельном расчете можно предположить, что динамического усреднения не происходит, и рассчитать величины КССВ для кристаллографической конформации ВРТИ, а затем использовать их наряду с величинами $F_{\text{ЯЭО}}^{\text{min}}$ для определения ротамера. В этом случае угол χ^1 однозначно определяется уже для 63% аминокислотных остатков ВРТИ. Таким образом, учет КССВ существенно облегчает определение ориентации боковой цепи.

Влияние времени обмена компонент намагниченности τ_m на результаты расчета локальной структуры. На рис. 11 приведены зависимости $F_{\text{ЯЭО}}^{\text{min}}$ от τ_m для трех ротамеров боковой цепи остатка Arg^{20} . В кристаллографической конформации ВРТИ у Arg^{20} реализуется ротамер g^+ . Для него величина $F_{\text{ЯЭО}}^{\text{min}}$ мала и слабо зависит от τ_m . Для других ротамеров (t и g^-) величина $F_{\text{ЯЭО}}^{\text{min}}$ велика и убывает с ростом τ_m . Это объясняется следующим образом. Ротамеры боковых цепей различаются интенсивностями кросс-пиков ЯЭО $\text{NH}_i(\text{NH}_{i+1})/\text{H}^{\beta 2}$ и $\text{NH}_i(\text{NH}_{i+1})/\text{H}^{\beta 3}$. С ростом τ_m эти интенсивности выравниваются, так как усиливается спиновая диффузия между гемминальными протонами $\text{H}^{\beta 2}$ и $\text{H}^{\beta 3}$ (в качестве примера мож-

фрагмент $\text{H}-\text{C}^\alpha\text{C}^\beta-\text{H}_2$



фрагмент $\text{H}-\text{C}^\alpha\text{C}^\beta-\text{H}$

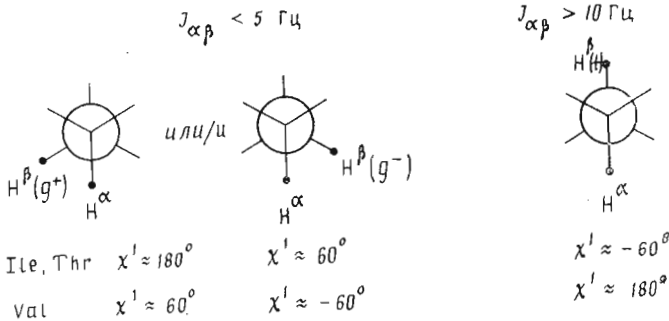


Рис. 10. Определение конформации боковой цепи на основе КССВ протонов $\text{H}-\text{C}^\alpha\text{C}^\beta-\text{H}$ ($J_{\alpha\beta}$). КССВ $J_{\alpha\beta}$, меньшие 5 и большие 10 Гц, свидетельствуют соответственно о *гош* (g^- или g^+) и *транс* (t) ориентации α - и β -протонов. Для остатков, включающих группы C^βH_2 и C^βH , указаны значения торсионного угла χ' , соответствующие возможным ориентациям (g^- , g^+ и t) α - и β -протонов

но сравнить при $\tau_m=100$ и 300 мс интенсивности кросс-пиков $\text{NH}_i/\text{H}_i^{\beta 2}$ и $\text{NH}_i/\text{H}_i^{\beta 3}$, приведенные на рис. 2). Поэтому выравнивается и величина $F_{\text{ЯЭО}}^{\text{min}}$ для всех ротамеров.

Итак, чем больше τ_m , тем меньше различаются ротамеры боковой цепи по величине штрафной функции $F_{\text{ЯЭО}}^{\text{min}}$. В то же время форма поверхностей $F_{\text{ЯЭО}}(\varphi_i, \psi_i)$ слабо зависит от τ_m (см. рис. 12) для всех остатков, кроме глицина. Для глицина спиновая диффузия выравнивает интенсивности кросс-пиков ЯЭО $\text{NH}_i(\text{NH}_{i+1})/\text{H}_i^{\alpha 2}$ и $\text{NH}_i(\text{NH}_{i+1})/\text{H}_i^{\alpha 3}$ и поэтому область малых значений $F_{\text{ЯЭО}}$ заметно расширяется при увеличении τ_m (рис. 13). Величины торсионных углов φ_i^{min} , ψ_i^{min} и χ_i^{min} , соответствующие минимуму $F_{\text{ЯЭО}}$, почти не зависят от τ_m в рассмотренном диапазоне от 50 до 200 мс (см. рис. 12, 13). Таким образом, весь диапазон можно использовать для определения торсионных углов φ и ψ .

С увеличением τ_m становится труднее различать ротамеры боковых цепей и определять торсионные углы остатков глицина. С другой стороны, с уменьшением τ_m падает интенсивность кросс-пиков ЯЭО в спектре NOESY и соответственно растет погрешность их измерения. Хорошим компромиссом, по-видимому, является величина $\tau_m=100$ мс, когда интенсивности кросс-пиков ЯЭО в спектрах NOESY достаточно велики (см.

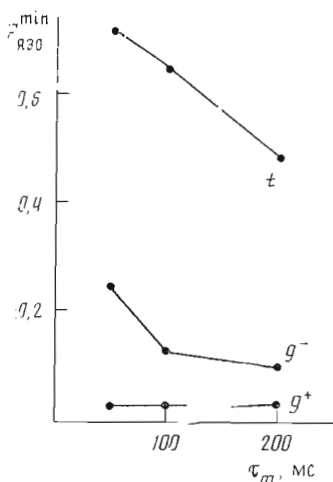


Рис. 11

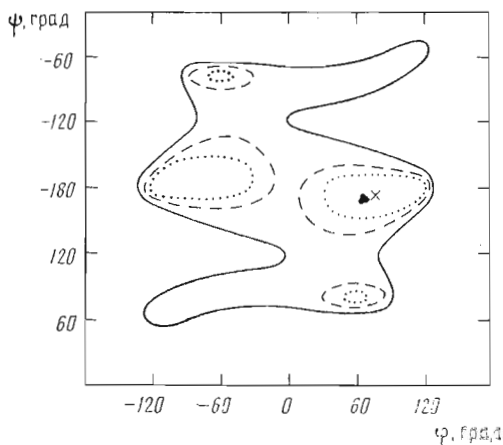


Рис. 13

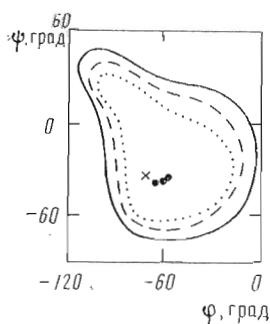


Рис. 12

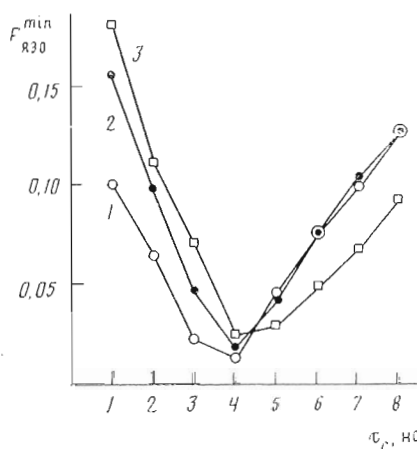


Рис. 14

Рис. 11. Зависимость $F_{ЯЭО}^{min}$ от τ_m для ротамеров t , g^- и g^+ боковой цепи Arg^{20} в дипептидном фрагменте Arg^{20}

Рис. 12. Влияние времени τ_m на форму области малых значений функции $F_{ЯЭО}(\phi, \psi)$ для дипептидного фрагмента Lys^{26} (ротамер g^+). Проведены изолинии $F_{ЯЭО}=0.2$ при $\tau_m=50, 100$ и 200 мс (соответственно пунктирная, штриховая и сплошная линии). Обозначения минимумов как на рис. 4

Рис. 13. Влияние времени τ_m на форму области малых значений функции $F_{ЯЭО}(\phi, \psi)$ для дипептидного фрагмента Gly^{57} . Обозначения как на рис. 12

Рис. 14. Зависимость минимального значения функции $F_{ЯЭО}$ ($F_{ЯЭО}^{min}$) от времени корреляции τ_c для дипептидных фрагментов Gly^{36} (1), Gly^{27} (2) и Gly^{56} (3)

рис. 2), а конформации остатков отчетливо дифференцируются по величине $F_{ЯЭО}$.

Определение времени корреляции вращения белковой глобулы τ_c . Время корреляции τ_c необходимо для расчета интенсивностей кросс-пиков ЯЭО по уравнениям (2–6). Его можно измерить экспериментально с помощью спектроскопии ^{13}C -ЯМР [13] или оценить, исходя из размеров белковой глобулы. Погрешность измерения или оценки τ_c служит дополнительным источником ошибок при анализе локальной структуры. Время корреляции τ_c существенно влияет на абсолютные значения интенсивностей кросс-пиков ЯЭО, поскольку от него линейно зависят элементы матрицы релаксации (уравнения (5, 6)). Однако погрешности в интенсивностях, связанные с ошибкой в величине τ_c , носят систематический характер (все интенсивности в дипептидном фрагменте одновременно воз-

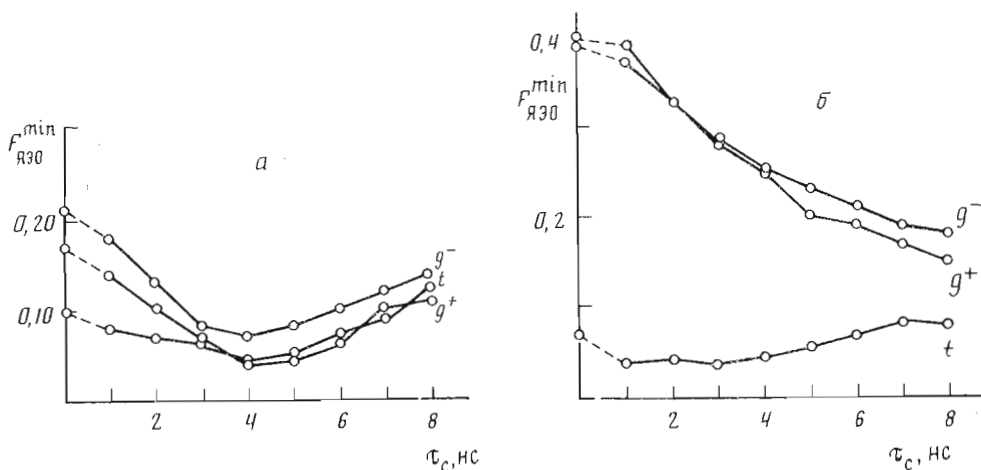


Рис. 15. Зависимость минимального значения функции $F_{ЯЭО}$ ($F_{ЯЭО}^{min}$) от времени корреляции τ_c для ротамеров t , g^- и g^+ дипептидных фрагментов Cys⁵³ (а) и Asn⁴³ (б). Точки на оси ординат соответствуют величинам $F_{ЯЭО}^{min}$, полученным при расчете интенсивностей кросс-пиков ЯЭО по модели «1/r⁶» (уравнение (7))

растают или уменьшаются) и поэтому компенсируются при нормировке интенсивностей в соответствии с уравнением (1). Полной компенсации не происходит в тех случаях, когда из-за спиновой диффузии величина τ_c определяет соотношение интенсивностей кросс-пиков ЯЭО, а не только их абсолютные значения.

Как уже отмечалось, значительная спиновая диффузия происходит лишь между гемминальными протонами и метильными группами. Эффективность этого процесса определяется временем корреляции τ_c . Поэтому τ_c влияет на интенсивности кросс-пиков ЯЭО с участием гемминальных α - или β -протонов (например, $NH_i/NH_i^{\beta 3}$ и $H_i^{\beta 3}/NH_{i+1}$ на рис. 2). При неправильно заданном времени корреляции возникают ошибки в расчете интенсивностей этих кросс-пиков, что приводит к увеличению функции $F_{ЯЭО}^{min}$ в 2–3 раза (см. $\Delta F_{ЯЭО}^{min}$ в табл. 3). При этом торсионные углы ϕ_i^{min} и ψ_i^{min} , соответствующие минимуму $F_{ЯЭО}$, изменяются незначительно. Если при выборе τ_c произошла ошибка в два раза, то торсионные углы ϕ_i^{min} и ψ_i^{min} изменятся в среднем на 5–10°, хотя для отдельных остатков они могут измениться на 30–40° (см. $\Delta\phi$ и $\Delta\psi$ в табл. 3). В то же время ошибка во времени τ_c иногда приводит к тому, что величина $F_{ЯЭО}^{min}$ для ротамера боковой цепи, соответствующего кристаллографической структуре белка, оказывается большей, чем у одного из других ротамеров. Такая ситуация затрудняет определение конформации боковой цепи и наблюдается для 27% остатков ВРТИ при заниженном в 2 раза времени корреляции τ_c (2 нс) и для 15% остатков — при завышенном в 2 раза τ_c (8 нс, если $\tau_m = 100$ мс).

Итак, при анализе конформаций боковых цепей возникает необходимость в достаточно точном определении времени корреляции τ_c . Для уточнения времени τ_c можно рассмотреть его как независимый параметр и найти его величину, обеспечивающую наилучшее согласование расчетных и экспериментальных интенсивностей кросс-пиков ЯЭО. На рис. 14 и 15 показаны характерные зависимости $F_{ЯЭО}^{min}$ от τ_c . Для всех дипептидных фрагментов ВРТИ минимумы этих зависимостей близки к 4 нс, т. е. к величине τ_c , использованной при моделировании экспериментальных интенсивностей кросс-пиков ЯЭО для ВРТИ.

Следует отметить, что минимум зависимости $F_{ЯЭО}^{min}(\tau_c)$ хорошо локализуется для остатков глицина (рис. 14), поскольку от τ_c существенно зависит соотношение интенсивностей кросс-пиков ЯЭО с участием гемминальных α -протонов ($NH_i(NH_{i+1})/H_i^{\alpha 2}$ и $NH_i(NH_{i+1})/H_i^{\alpha 3}$). Для других

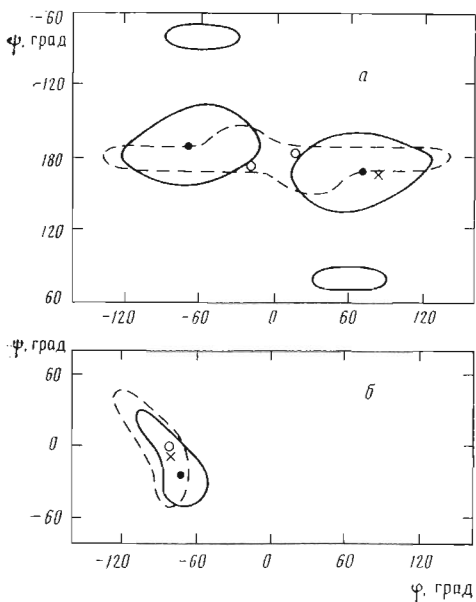


Рис. 16. Области малых значений функции $F_{\text{ЯЭО}}(\varphi, \psi)$ для дипептидных фрагментов Glu^{57} (а) и Lys^{66} (б), полученные при расчете интенсивностей кросс-пиков ЯЭО по модели « $1/r^6$ » (уравнение (7)) (штриховая линия) и модели, учитывающей взаимодействие протонов в дипептидном фрагменте (уравнения (2–6)) при $\tau_c = 4$ нс, $\tau_m = 100$ мс (сплошная линия). Проведены изолинии $F_{\text{ЯЭО}} = F_{\text{ЯЭО}}^{\min} + 0.2$ (как на рис. 5). Указаны положения глобальных минимумов функции $F_{\text{ЯЭО}}(\varphi, \psi)$ для модели, учитывающей взаимодействие протонов в дипептидном фрагменте (черный кружок) и модели « $1/r^6$ » (кружок). Крестик соответствует кристаллографической конформации остатка

остатков ситуация сложнее, так как зависимость $F_{\text{ЯЭО}}^{\min}(\tau_c)$ строится при трех возможных конформациях боковой цепи (рис. 15) и ее минимум может быть плохо выражен. Например, для ротамеров g^- и g^+ на рис. 15б, характеризующихся значительной величиной $F_{\text{ЯЭО}}^{\min}$ при $\tau_c = 4$ нс, штрафная функция просто убывает с ростом τ_c , поскольку все интенсивности выравниваются. Зато для ротамеров боковой цепи, характеризующихся малой величиной $F_{\text{ЯЭО}}^{\min}$, минимум хорошо выражен, независимо от того, соответствует ли ротамер кристаллографической конформации ВРТИ (рис. 15б), но только в тех случаях, когда интенсивности кросс-пиков ЯЭО $\text{NH}_i(\text{NH}_{i+1})/\text{H}_i^{\beta 2}$ и $\text{NH}_i(\text{NH}_{i+1})/\text{H}_i^{\beta 3}$ существенно отличаются друг от друга.

Применение модели « $1/r^6$ » для определения локальной структуры. Итак, торсионные углы и время корреляции τ_c можно определить, если использовать для вычисления интенсивностей кросс-пиков ЯЭО модель, учитывающую все пути передачи намагниченности в дипептидном фрагменте (уравнения (2–6)). Однако часто используют более простую модель, предположив, что время τ_m выбрано достаточно коротким и интенсивность каждого кросс-пика ЯЭО (I_{pq}) зависит только от расстояния r_{pq} между p -м и q -м протонами (модель « $1/r^6$ ») [23, 24]:

$$I_{pq} = \alpha / r_{pq}^6 \quad (7)$$

где коэффициент пропорциональности α предполагается одинаковым для всех пар протонов и сокращается при нормировке интенсивностей в уравнении (1). Представляется интересным оценить, как скажется отсутствие учета взаимодействия между всеми парами протонов в дипептидном фрагменте, времен τ_c , τ_m и T_1 на результаты анализа локальной структуры.

На рис. 16 и в табл. 3 сопоставлены результаты расчета локальной структуры ВРТИ при использовании модели « $1/r^6$ » и модели взаимодействия протонов в дипептидном фрагменте. Сплошная диффузия, которая не учитывается в модели « $1/r^6$ », существенно влияет лишь на интенсивности кросс-пиков ЯЭО с участием геминальных протонов. Поэтому при расчете интенсивностей по уравнению (7) значения торсионных углов φ_i^{\min} и ψ_i^{\min} , погрешность их определения (табл. 3) и форма поверхностей $F_{\text{ЯЭО}}(\varphi, \psi)$ меняются незначительно (см., например, рис. 16), хотя и сильнее, чем при ошибке во времени корреляции τ_c в 2 раза. Однако существенно то, что для модели « $1/r^6$ » заметно возрастают значения $F_{\text{ЯЭО}}^{\min}$ (табл. 3) и из-

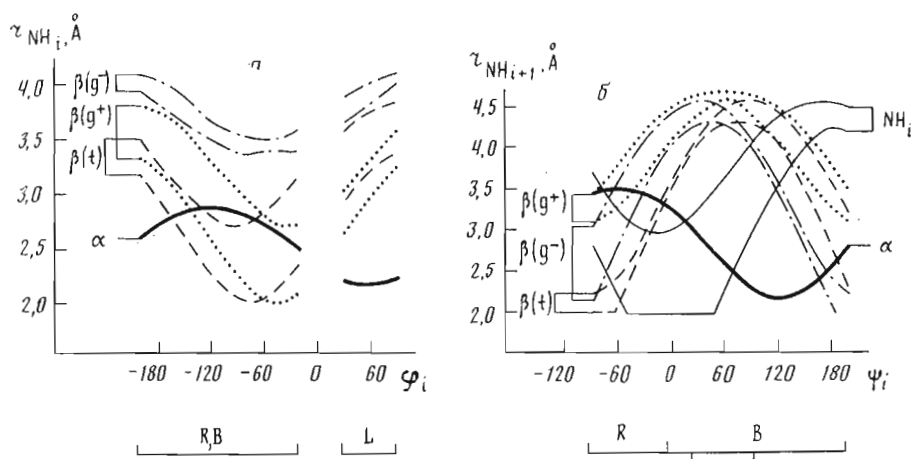


Рис. 17. Зависимости межпротонных расстояний r в дипептидном фрагменте от углов φ_i (а) и ψ_i (б) рассматриваются только стерически разрешенные области значений торсионных углов φ_i и ψ_i (R, B и L). Рядом с каждой кривой (или парой кривых, задающих интервал расстояний) указан протон i -го остатка, до которого рассчитывалось соответствующее расстояние от протонов NH_i (а) и NH_{i+1} (б). Интервалы расстояний до β -протонов получены путем изменения угла χ_i^1 в диапазоне $\pm 30^\circ$ относительно 60 , -60 или 180° при каждом значении соответствующего угла φ_i или ψ_i . Для расстояния $\text{NH}_i \dots \text{NH}_{i+1}$ интервал определялся путем изменения торсионного угла φ_i во всем диапазоне стерически разрешенных значений при каждом значении угла ψ_i .

меняется их соотношение для ротамеров боковых цепей. Если использовать модель « $1/r^6$ », то, например, для остатка Cys^{53} существенно выигрывает по величине $F_{\text{ЯЭО}}^{\text{min}}$ ротамер t , а не g^+ , реализующийся в кристаллографической конформации белка и оптимальный при $\tau_c = 4$ нс для модели взаимодействия протонов в дипептидном фрагменте (Cys^{53} на рис. 15). Аналогичная ситуация имеет место почти для половины аминокислотных остатков ВРГГ (при $\tau_m = 100$ мс). Таким образом, модель « $1/r^6$ » менее корректна и должна использоваться с осторожностью, особенно при определении конформаций боковых цепей.

Упрощенный способ анализа локальной структуры белка по интенсивностям кросс-пиков ЯЭО и КССВ. Рассмотренная выше расчетная модель позволяет определить торсионные углы, наилучшим образом согласующиеся с интенсивностями кросс-пиков ЯЭО. Тем не менее для предварительной оценки локальной структуры можно просто сравнить интенсивности кросс-пиков ЯЭО, приведенные в табл. 1. Каждая конформация дипептидного фрагмента обладает своим характерным набором межпротонных расстояний, которые коррелируют с интенсивностями соответствующих кросс-пиков ЯЭО. Используя зависимости расстояний от торсионных углов (рис. 17), можно выработать алгоритм для определения реализующихся в белке конформаций, включающий следующие этапы.

1. Оценка конформаций боковых цепей по КССВ $J_{\alpha\beta}$. Воспользовавшись рис. 10, нужно для каждого аминокислотного остатка определить один или два возможных ротамера боковой цепи и обозначить β -протоны как *гош* ($\text{H}_i^\beta g$) и *транс* ($\text{H}_i^\beta t$) по отношению к протону H_i^α .

2. Оценка торсионного угла φ_i по интенсивностям кросс-пиков ЯЭО, образованных протоном NH_i . Используя интенсивность кросс-пика $\text{NH}_i/\text{H}_i^\alpha$, все остатки, кроме глицина, можно отчетливо разграничить на две группы, в одной из которых угол $\varphi_i = 30-80^\circ$, т. е. соответствует области L, а в другой $\varphi_i = -200 \div 20^\circ$, т. е. соответствует областям R и B конформационной карты (рис. 5). Область L характеризуется аномально высокой интенсивностью кросс-пика $\text{NH}_i/\text{H}_i^\alpha$, поскольку расстояние $\text{NH}_i \dots \text{H}_i^\alpha$ здесь ($\sim 2,2$ Å, см. рис. 17а) существенно короче, чем в областях R и B (2,5–2,9 Å). Например, единственный остаток ВРГГ, нахо-

дящийся в области L (Arg^{39}), легко выявляется, поскольку интенсивность кросс-пика $\text{NH}_i/\text{H}_i^\alpha$ для него в 3–5 раз выше, чем для всех остальных остатков, за исключением глицина (табл. 1). Интенсивность кросс-пика ЯЭО $\text{NH}_i/\text{H}_i^\beta$ также позволяет ограничить интервал значений угла φ_i . Для остатков, находящихся в областях R или B, угол $\varphi_i = -160 \div -20^\circ$, если выполняется соотношение интенсивностей $I(\text{NH}_i/\text{H}_i^\beta(g \text{ или } t)) \geq I(\text{NH}_i/\text{H}_i^\alpha)$, в чем легко убедиться, сравнив соответствующие межпротонные расстояния на рис. 17а.

3. Определение диапазона значений угла φ_i по интенсивностям кросс-пиков ЯЭО с участием протона NH_{i+1} . Здесь среди всех остатков рассматриваемого белка прежде всего нужно выделить две группы остатков, одна из которых отчетливо соответствует области B, а другая — области R конформационной карты (рис. 5). В области B ($\varphi_i = 0-200^\circ$) интенсивность кросс-пика ЯЭО $\text{H}_i^\alpha/\text{NH}_{i+1}$ должна быть существенно выше, чем $\text{NH}_i/\text{NH}_{i+1}$, а в области R ($\varphi_i = -90-0^\circ$), наоборот, должно выполняться соотношение интенсивностей $I(\text{H}_i^\alpha/\text{NH}_{i+1}) \ll I(\text{NH}_i/\text{NH}_{i+1})$, поскольку области B и R существенно отличаются расстояниями $\text{H}_i^\alpha \dots \text{NH}_{i+1}$ и $\text{NH}_i \dots \text{NH}_{i+1}$: при $\varphi_i > 90^\circ$ короче первое расстояние, а при $\varphi_i < 0^\circ$ — второе (рис. 17б). Для ВРТИ в эти две группы попадают все остатки, кроме Lys^{15} и Arg^{39} : интенсивность кросс-пика $\text{H}_i^\alpha/\text{NH}_{i+1}$ в области B в 8–25 раз выше, а в области R в 4–6 раз ниже, чем $\text{NH}_i/\text{NH}_{i+1}$ (табл. 1). Кроме того, в области R должно выполняться соотношение $I(\text{H}_i^\beta t/\text{NH}_{i+1}) > I(\text{H}_i^\alpha/\text{NH}_{i+1})$, что следует из сравнения соответствующих межпротонных расстояний (рис. 17б). Если это соотношение не выполняется, то угол φ_i отвечает «перешейку» между областями R и B или области L ($-10-60^\circ$). Области «перешейка» ($0-80^\circ$) соответствует и угол φ_i тех остатков (например, Lys^{15} и Arg^{39} ВРТИ), для которых кросс-пики $\text{NH}_i/\text{NH}_{i+1}$ и $\text{H}_i^\alpha/\text{NH}_{i+1}$ сравнимы по интенсивности, причем интенсивность кросс-пика $\text{H}_i^\alpha/\text{NH}_{i+1}$ больше, чем для остатков в области R, но меньше, чем в области B. Следует отметить, что у остатка в области B интенсивность $I(\text{H}_i^\beta(g \text{ или } t)/\text{NH}_{i+1})$ может быть больше или близка к $I(\text{H}_i^\alpha/\text{NH}_{i+1})$. Это означает, что угол $\varphi_i = 150-200^\circ$, так как только в этом случае расстояние $\text{H}_i^\beta \dots \text{NH}_{i+1}$ может быть короче, чем $\text{H}_i^\alpha \dots \text{NH}_{i+1}$ (см. рис. 17б).

Таким образом, весь диапазон стерически разрешенных значений углов основной цепи φ_i и ψ_i можно разграничить на пять областей, качественно различающихся интенсивностями кросс-пиков ЯЭО: области L, R «перешеек» между R и B, центральная часть области B и верхний участок области B ($\varphi_i > 150^\circ$) конформационной карты. Области малых значений $F_{\text{ЯЭО}}$, типичные для перечисленных случаев, приведены на рис. 5.

4. Уточнение конформаций боковых цепей по интенсивностям кросс-пиков ЯЭО между протонами $\text{NH}_i(\text{NH}_{i+1})$ и H_i^β . Как отмечалось выше, по КССВ $J_{\alpha\beta}$ можно сделать вывод о динамическом усреднении нескольких ротамеров боковой цепи (если $10 \text{ Гц} > J_{\alpha\beta} > 5 \text{ Гц}$), либо однозначно определить величину угла χ_i^1 , либо выделить два возможных значения χ_i^1 (например, -60 и 180° для остатков, включающих группу C^βH_2 , см. рис. 10). В последнем случае величину угла χ_i^1 можно установить однозначно, если выполняется одно из следующих двух условий. Во-первых, если для остатка в области B или R наблюдается соотношение интенсивностей $I(\text{NH}_i/\text{H}_i^\beta g) \geq I(\text{NH}_i/\text{H}_i^\beta t)$, то его угол $\chi_i^1 = 180^\circ$. Во-вторых, если в области B $I(\text{H}_i^\beta g/\text{NH}_{i+1}) \geq I(\text{H}_i^\alpha/\text{NH}_{i+1})$, то $\chi_i^1 = -60^\circ$ для остатков, включающих группу C^βH_2 и валина и $\chi_i^1 = 60^\circ$ для остатков изолейцина и треонина. Указанные условия можно обосновать с помощью рис. 17. Следует отметить, что они оказываются не очень эффективными, так как выполняются для небольшого числа аминокислотных остатков и, в частности, позволяют установить угол χ_i^1 (-60°) лишь для остатков Arg^{20} и Lys^{41} ВРТИ.

Заключение

Итак, проведенный модельный расчет показал, что локальные конформации аминокислотных остатков можно успешно определять путем согласования интенсивностей кросс-пиков ЯЭО, рассчитанных для полной матрицы релаксации протонов дипептидных фрагментов белка, и интенсивностей, измеренных экспериментально в спектре NOESY. Углы основной цепи φ и ψ определяются однозначно для всех остатков, кроме глицина, а χ^1 — для большинства остатков белка. На начальном этапе расчета следует определить время корреляции вращения белковой глобулы τ_c путем минимизации функции $F_{\text{ЯЭО}}(\tau_c)$. Существенно, что для анализа локальной структуры небольших белков ($\tau_c=1-4$ нс) пригодны интенсивности кросс-пиков ЯЭО, измеренные при временах обмена компонент намагниченности $\tau_m=100-200$ мс, обеспечивающих оптимальное отношение сигнал/шум в спектрах NOESY.

Для предварительной оценки торсионных углов основной цепи φ и ψ можно использовать приближенную модель « $1/r^6$ », в которой предполагается, что интенсивность каждого кросс-пика ЯЭО обратно пропорциональна шестой степени расстояния между двумя выделенными протонами. Однако из-за сильной спиновой диффузии между тесно сближенными геминальными β -протонами эта модель мало пригодна для количественного анализа конформаций боковых цепей.

Величины торсионных углов φ , ψ и χ^1 можно приближенно оценить, сравнивая интенсивности кросс-пиков ЯЭО между собой. Соответствующие правила для упрощенного анализа локальной структуры позволяют отчетливо разграничить конформации остатков, относящиеся к различным стерически разрешенным областям (R, B и L) конформационной карты $\varphi-\psi$, но ротамер боковой цепи удается однозначно определить лишь для ограниченного числа остатков.

Экспериментальная часть

Расчет интегральных интенсивностей кросс-пиков ЯЭО. Модельные интенсивности вычисляли для целой молекулы ВРТИ по уравнениям (2–6). При этом использовали координаты протонов, реконструированные по координатам неводородных атомов ВРТИ, взятым из банка кристаллографических структур белков [11]. Координаты каждого протона (H) рассчитывали по координатам трех атомов (A, B и C), выбранным таким образом, чтобы они образовывали последовательность валентно связанных атомов A–B–C–H. Протон H располагали на связи B–C так, чтобы расстояние H...C соответствовало длине связи C–H, а затем последовательно поворачивали на валентный угол B–C–H в плоскости AB и на фазовый угол, кратный 60° , вокруг связи B–C. Время корреляции τ_c ВРТИ принято равным 4 нс [12]. Времена T_1 индивидуальных протонов и групп CH_3 ВРТИ измерены методом «инверсия – восстановление» [13] на ЯМР-спектрометре WM-500 Bruker (ФРГ) (рабочая частота для протонов 500 МГц) для 5 мМ раствора белка в H_2O при pH 3,2 и 30°C . В расчетах использовали времена T_1 , характерные для однотипных протонов и групп: 0,5 с для групп CH_3 , 0,75 с для протонов H^α , 0,7 с для остальных алифатических протонов, 0,85 с для протонов NH и 1,1 с для ароматических протонов.

Для изолированных дипептидных фрагментов ВРТИ интенсивности кросс-пиков ЯЭО вычисляли также по уравнениям (2–6), используя измеренные времена T_1 . При этом для расчета координат протонов при заданных значениях торсионных углов φ , ψ , χ использовали геометрию аминокислотных остатков из библиотеки ECEPP/2 [25, 26], а угол ω пептидных групп предполагали равным 180° . Боковые цепи остатков Met, Glu, Gln, Lys и Arg аппроксимировали фрагментом $\text{C}^\beta\text{H}_2-\text{C}^\gamma\text{H}_2$, что позволяет сократить счетное время, необходимое для вычисления интенсивностей кросс-пиков ЯЭО.

Функцию $F_{\text{ЯЭО}}$ вычисляли по уравнению (1), причем для каждого дипептидного фрагмента суммировали только кросс-пики ЯЭО с участием амидных протонов NH_i и NH_{i+1} (для предпролиновых остатков вместо NH_{i+1} рассматривали два δ -протона пролина). В уравнении (1) учитывали также и кросс-пики ЯЭО, имеющие близкую к нулю интенсивность. Кросс-пики между алифатическими протонами не рассматривали, с тем чтобы приблизиться к реальной ситуации. Обычно соответствующая область спектров NOESY неудобна для измерения интенсивностей кросс-пигов из-за их сильного перекрывания.

При анализе локальной структуры необходимо учитывать неоднозначность стереохимического отнесения сигналов метиленовых протонов и групп CH_3 остатков валина и лейцина. С этой целью использовали методику, реализованную в программе CONFORNMR [27] и видоизмененную для учета интенсивностей кросс-пигов ЯЭО вместо межпротонных расстояний. По этой методике при каждом вычислении функции $F_{\text{ЯЭО}}(\varphi_i, \psi_i, \chi_i)$ проводится перебор возможных вариантов стереохимического отнесения и выбирается тот вариант, который при данных значениях углов $\varphi_i, \psi_i, \chi_i$ лучше согласуется с КССВ и интенсивностями кросс-пигов ЯЭО.

Анализ зависимостей $F_{\text{ЯЭО}}(\varphi_i, \psi_i, \chi_i)$. Поскольку функция $F_{\text{ЯЭО}}(\varphi_i, \psi_i, \chi_i)$ может иметь несколько локальных минимумов (см. рис. 4), поиск ее глобального минимума осуществляли путем минимизации функции для следующей серии начальных значений углов: $(\varphi, \psi) = (-60, -60^\circ), (60, 60^\circ), (-90, 90^\circ), (-90, 150^\circ), (-150, 90^\circ)$ и $(-150, 150^\circ)$ для всех остатков, кроме Gly и Pro; $\chi^1 = -60, 60$ и 180° ; $\chi^2 = -60, 60$ и 180° для Leu; $\chi^2 = 90^\circ$ для Phe, Tyr, His; $\chi^2 = 180^\circ$ для остальных остатков (рассматривали все возможные комбинации перечисленных значений φ, ψ, χ^1 и χ^2 соответствующих остатков). Для дипептидных фрагментов остатков пролина рассматривали значения $\psi = -60$ и 120° , а для Gly — все возможные комбинации значений φ, ψ в интервале от -180 до 180° с шагом 60° . После серии локальных минимизаций выбирали наименьшее значение функции $F_{\text{ЯЭО}}$. Для минимизации использовали квазиньютоновский метод с разностной аппроксимацией производных [28], причем варьировали все торсионные углы, включая углы вращения метильных групп. Область изменения угла χ^1 при минимизации ограничивали интервалом $\pm 30^\circ$ относительно стандартного для ротамера значения $60, -60$ или 180° .

Карты $F_{\text{ЯЭО}}(\varphi_i, \psi_i)$ (рис. 4–7) строили с шагом 20° . При каждой паре значений φ_i и ψ_i угол χ_i^1 варьировали в интервале $\pm 30^\circ$ с шагом 10° относительно стандартного угла $60, -60$ или 180° и отбирали наименьшее для этого интервала значение $F_{\text{ЯЭО}}$. Расстояния до протонов ароматических колец остатков Phe и Tyr и групп C^6H_3 лейцина существенно зависят не только от угла χ^1 , но и от χ^2 . Для этих остатков наряду с χ^1 варьировали также угол χ^2 (в интервале $\pm 30^\circ$). Для остальных остатков (Met, Glu, Gln, Lys, Arg, Thr, Ile, Asn) угол χ^2 принимали равным 180° .

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wuthrich K.* NMR of proteins and nucleic acids. N. Y.: Wiley, 1986.
2. *Bystrov V. F.* // Soviet Scientific Reviews. D. Physicochemical Biology Reviews. V. 5. / Ed. Sculachev V. P. Amsterdam: Harwood Acad. Publ., 1984. P. 207–275.
3. *Braun W.* // Quart. Rev. Biophys. 1987. V. 19. № 3/4. P. 115–157.
4. *Clare G. M., Cronenborn A. M.* // Protein Eng. 1987. V. 1. № 4. P. 275–288.
5. *Соболь А. Г., Арсеньев А. С.* // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 8. С. 997–1013.
6. *Marion D., Genest M., Ptak M.* // Biophys. Chem. 1987. V. 28. № 3. P. 235–244.
7. *Madrid M., Jardetzky O.* // Biochim. et biophys. acta. 1988. V. 953. № 1. P. 61–69.
8. *Braun W., Go N.* // J. Mol. Biol. 1985. V. 186. № 3. P. 611–626.
9. *Arseniev A., Schultze P., Worgotter E., Braun W., Wagner G., Vasak M., Kagi J.H.R., Wuthrich K.* // J. Mol. Biol. 1988. V. 201. № 3. P. 637–657.
10. *Deisenhofer J., Steigemann W.* // Acta cryst. 1975. V. B31. № 1. P. 238–250.
11. *Bernstein F. C., Koetzle T. F., Williams G. J. B., Meyer F. F., Brice M. D., Rodgers J. R., Kennard O., Shimanouchi T., Tasumi M.* // J. Mol. Biol. 1977. V. 112. № 3. P. 535–542.
12. *Richarz R., Nagayama K., Wuthrich K.* // Biochemistry. 1980. V. 19. № 23. P. 5189–5196.

13. McDonald G. G., Leigh J. S. // J. Magn. Reson. 1973. V. 9. № 3. P. 358-362.
14. Keepers J. W., James T. L. // J. Magn. Reson. 1984. V. 57. № 3. P. 404-426.
15. Bodenhausen G., Ernst R. R. // J. Amer. Chem. Soc. 1982. V. 104. № 5. P. 1304-1309.
16. Bremer J., Mendz G. L., Moore W. J. // J. Amer. Chem. Soc. 1984. V. 106. № 17. P. 4691-4696.
17. Macura S., Ernst R. R. // Mol. Phys. 1980. V. 41. № 1. P. 95-117.
18. Kalk A., Rerendsen H. J. C. // J. Magn. Reson. 1976. V. 24. № 3. P. 343-366.
19. Tropp J. J. // J. Chem. Phys. 1980. V. 72. № 11. P. 6035-6043.
20. Arseniev A. S., Sobol A. G., Bystrov V. F. // J. Magn. Reson. 1986. V. 70. № 3. P. 427-435.
21. LeMaster D. M., Kay L. E., Brunger A. T., Prestgard J. H. // FEBS Lett. 1988. V. 236. № 1. P. 71-76.
22. Bystrov V. F. // Progress in NMR spectrosc. 1976. V. 10. Part 1. P. 41-81.
23. Саулурич Ю. Б., Луениньш Э. Э. // Биоорганич. химия. 1987. Т. 13. № 2. С. 168-176.
24. Clore G. M., Gronenborn A. M. // J. Magn. Reson. 1985. V. 61. № 1. P. 158-164.
25. Motany F. A., McGuire R. F., Burgess A. W., Scheraga H. A. // J. Phys. Chem. 1975. V. 79. № 22. P. 2361-2381.
26. Nemethy G., Pottle M. S., Scheraga H. A. // J. Phys. Chem. 1983. V. 87. № 11. P. 1883-1887.
27. Арсеньев А. С., Ломизе А. Л., Барсуков И. Л., Быстров В. Ф. // Биол. мембраны. 1986. Т. 3. № 11. С. 1077-1104.
28. Демидович А. К. Математическое обеспечение ЕС ЭВМ. 1977. Вып. 17. С. 45-47.

Поступила в редакцию
16.III.1989

A. L. LOMIZE, A. G. SOBOL, A. S. ARSENIYEV

DETERMINATION OF LOCAL STRUCTURE OF PROTEINS FROM TWO-DIMENSIONAL ^1H NMR DATA

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

A method is proposed to determine conformations of amino acid residues of the protein and effective correlation time τ_c from cross-peak intensities in two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (NOESY) spectra. The method consists in fitting complete relaxation matrix of dipeptide unit protons to experimental cross-peak intensities by varying φ , ψ , χ torsional angles and τ_c . To verify the method, NOESY spectra of basic pancreatic trypsin inhibitor (BPTI) were theoretically generated at mixing times $\tau_m=25-300$ ms and $\tau_c=4$ ns and used for local structure determination. The method works well with optimum for measurement of NOE intensities τ_m 100-200 ms. As a result, the backbone φ , ψ torsion angles were unambiguously determined at $\tau_m=100$ ms for all but Gly residues of BPTI, and χ^1 angles were determined for the majority of side chains. The obtained dipeptide unit conformations are very close to the BPTI crystallographic structure: root mean square deviation (RMSD) of interproton distances within dipeptide units, on the average, is 0,08 Å (maximal deviation 0,44 Å), and RMSD of φ and ψ angles are 18 and 9°, respectively (maximal deviations are 44 and 22°).