



УДК 547.963.02 : 543.422.25 : 577.322.523

© 1991 г.

И. В. Масленников, А. Л. Ломизе, А. С. Арсеньев

КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ СЕГМЕНТА В БАКТЕРИООПСИНА
ПО ДАННЫМ ДВУМЕРНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ^1H -ЯМР

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва

Проведено уточнение пространственной структуры синтетического пептида, аналога трансмембранного сегмента В (остатки 34 — 65) бактериоопсина *Halobacterium halobium*. По количественным данным, полученным из спектров NOESY, путем расчета локальной структуры, минимизации конформационной энергии и штрафной функции определена структура пептида: правая α -спираль с остатка Asp-38 по остаток Tyr-64. Наиболее стабильный участок включает в себя остатки 42 — 60. На участке 34 — 37 реализуется набор неупорядоченных структур, близких к развернутым конформациям. Присутствие остатка Pro-50 в α -спирали обуславливает излом ее оси на угол 27° . Полученная структура согласуется с электронно-микроскопической моделью бактериородопсина. Однако для большинства аминокислотных остатков конформации боковых цепей сегмента В в растворе отличаются от определенных ранее по данным электронной микроскопии.

В состав бактериородопсина — белка пурпурной мембраны *Halobacterium halobium* [1, 2] входит одна полипептидная цепь из 248 остатков [3, 4] и ретинальный хромофор, связанный с остатком лизина-216 [5]. Реконструкция пространственной структуры по данным электронной крио-микроскопии показала, что почти перпендикулярно плоскости мембраны расположены семь α -спиральных областей, которые соотносены с аминокислотной последовательностью бактериородопсина [6].

Методы двумерной ^1H -ЯМР-спектроскопии эффективны для изучения пространственной структуры пептидов и небольших белков как в водном растворе, так и в условиях, имитирующих гидрофобную среду биологических мембран (мицеллы или органические растворители) [7]. Показано [8], что бактериородопсин, солюбилизованный в смеси хлороформ — метанол, сохраняет вторичную структуру нативного белка в пурпурной мембране и обладает специфической третичной структурой. Более того, индивидуальные фрагменты бактериородопсина, выделенные после расщепления полипептидной цепи, сохраняют в этой смеси органических растворителей конформацию, характерную для интактной молекулы.

Эти наблюдения позволяют предложить схему «модульной сборки» пространственной структуры мембранных белков. Конформации α -спиральных фрагментов определяют независимо с помощью конформационного анализа на основе данных 2D-ЯМР, а пространственную упаковку фрагментов осуществляют с использованием данных ЯМР и ЭПР (см., например, [9]) о контактах между спиральями, приближенной структуры бактериородопсина, полученной с помощью электронной микроскопии. Дополнительно учитывают стерические ограничения, критерии компактной упаковки, результаты минимизации конформационной энергии и некоторые априорные соображения.

К настоящему времени проведен первичный анализ данных ЯМР и охарактеризованы конформации протеолитических фрагментов 163—

Список сокращений: sB — (34—65)-[N1c^{56,60}]бактериоопсин, сегмент В; VPTI — панкреатический трипсиновый ингибитор; I5A — инсектотоксин скорпиона *Buthus eupeus*; ЯЭО — ядерный эффект Оверхаузера; NOESY — спектроскопия ЯЭО; DQF-COSY — корреляционная спектроскопия с двухквантовым фильтром; RMSD — среднеквадратичное отклонение.

231 (трансмембранные сегменты F и G) [10] и 1—71 (A и B) [11], синтетических аналогов трансмембранных сегментов B [12], D [13] и G [14], солюбилизованных в смеси хлороформ — метанол, а также синтетического аналога сегмента B, встроенного в мицеллы додецилсульфата натрия [15].

В настоящей работе на основе интегральных интенсивностей кросс-пиков в двумерных спектрах ЯЭО проведен расчет пространственной структуры трансмембранного сегмента B (остатки 34—65 бактериоопсина) (sB), солюбилизованного в смеси хлороформ — метанол (1 : 1), 0,1 M LiClO₄.

Методика уточнения пространственной структуры

Соответствие рассчитанных конформаций sB экспериментальным данным оценивали, используя среднеквадратичное отклонение межпротонных расстояний в данной конформации от расстояний, вычисленных (см. ниже) исходя из измеренных в спектрах NOESY интенсивностей кросс-пиков ЯЭО (штрафная функция F_r). В тех случаях, когда две или более конформаций близки по значению функции F_r , использовали среднее отклонение экспериментальных и рассчитанных для данной конформации интенсивностей кросс-пиков ЯЭО (штрафная функция F_I).

$$F_r = \left[\frac{\sum_{k=1}^N (\Delta r_k^{\text{эф}})^2}{N} \right]^{1/2}, \quad (1)$$

где N — число кросс-пиков для фрагмента молекулы (пептидная единица при расчете локальной структуры или фрагмент $[i - 5, i + 5]$ при переборе конформаций боковых цепей); $\Delta r_k^{\text{эф}}$ — отклонение эффективных расстояний между протонами в данной структуре от расстояний, оцененных по модели « $1/r^6$ » для интенсивности k -го кросс-пика ЯЭО. Эффективное расстояние $r^{\text{эф}}$ введено из-за присутствия суммарных кросс-пиков в спектре NOESY, обусловленных взаимодействием нескольких пар протонов, и определяется:

$$r_k^{\text{эф}} = \left(\sum_{p,q} r_{pq}^{-6} \right)^{-1/6}, \quad (2)$$

здесь r_{pq} — расстояние между протонами p и q , химические сдвиги которых соответствуют k -му кросс-пику ЯЭО. Отклонение эффективных расстояний между протонами ($\Delta r_k^{\text{эф}}$) определяется:

$$\Delta r_k^{\text{эф}} = \begin{cases} 0, & \text{если } r_k^{\text{эф}+} \geq r_k^{\text{эф}} \geq r_k^{\text{эф}-} \\ r_k^{\text{эф}} - r_k^{\text{эф}+}, & \text{если } r_k^{\text{эф}} > r_k^{\text{эф}+} \\ r_k^{\text{эф}} - r_k^{\text{эф}-}, & \text{если } r_k^{\text{эф}} < r_k^{\text{эф}-} \end{cases} \quad (3)$$

Интервал расстояний $[r_k^{\text{эф}-}, r_k^{\text{эф}+}]$, соответствующий экспериментальной интенсивности кросс-пика ЯЭО $I_k^{\text{эксп}}$ вычисляли по формулам:

$$r_k^{\text{эф}+} = r_k^{\text{эф}} [I_k^{\text{расч}} / (I_k^{\text{эксп}} - \Delta I_k)]^{1/6}, \quad (4)$$

$$r_k^{\text{эф}-} = r_k^{\text{эф}} [I_k^{\text{расч}} / (I_k^{\text{эксп}} + \Delta I_k)]^{1/6},$$

здесь $I_k^{\text{расч}}$ и $I_k^{\text{эксп}}$ — расчетные и экспериментальные интенсивности кросс-пиков ЯЭО, нормированные на среднюю интенсивность в анализируемом наборе кросс-пиков. При этом расчетная интенсивность кросс-пика ЯЭО ($I_k^{\text{расч}}$) представляет собой сумму элементов матрицы интегральных интенсивностей кросс-пиков ЯЭО (формулы 7—8) для пар протонов, химические сдвиги которых соответствуют k -му кросс-пику ЯЭО в спектре NOESY, а ΔI_k — погрешность измерения интенсивности k -го кросс-пика, оцененная следующим образом:

$$\Delta I_k = \max \{ \Delta I_1, \Delta I_2 \cdot I_k^{\text{эксп}} \}, \quad (5)$$

ΔI_1 — абсолютная ошибка, соответствующая уровню шума в спектре NOESY, принималась равной 0,1 от средней интенсивности кросс-пиков в спектре, а ΔI_2 — относительная ошибка измерения объема $I_k^{\text{экс}}$ задавалась равной 0,2 от величины $I_k^{\text{экс}}$, т. е. уровень шума оценили равным 10% средней интенсивности кросс-пиков ЯЭО в спектре, а ошибка измерения интенсивностью составляла 20%.

Штрафную функцию F_I вычисляли по формуле

$$F_I = 1/N \sum_{k=1}^N \begin{cases} |I_k^{\text{экс}} - I_k^{\text{расч}}| - \Delta I_k, & \text{если } |I_k^{\text{экс}} - I_k^{\text{расч}}| > \Delta I_k \\ 0, & \text{если } |I_k^{\text{экс}} - I_k^{\text{расч}}| \leq \Delta I_k \end{cases} \quad (6)$$

Матрицу интегральных интенсивностей кросс-пиков ЯЭО $\mathbf{V}(\tau_m)$ рассчитывали с учетом взаимодействия всех протонов в системе [16—18]:

$$\mathbf{V}(\tau_m) = \exp(-\mathbf{R}\tau_m) \mathbf{V}_0 = \mathbf{D} \exp(-\Lambda\tau_m) \mathbf{D}^{-1} \mathbf{V}_0, \quad (7)$$

где τ_m — время обмена компонент намагниченности; \mathbf{R} — матрица релаксации; \mathbf{D} — матрица собственных векторов матрицы \mathbf{R} ; Λ — диагональная матрица, содержащая собственные значения матрицы \mathbf{R} ; \mathbf{V}_0 — диагональная матрица, описывающая состояние спиновой системы перед началом импульсной последовательности NOESY.

Для учета неравновесности исходного состояния системы спинов элементы диагональной матрицы \mathbf{V}_0 вычисляли по формуле [19]

$$v_{pp} = 1 - \exp[-(t_2 + D1)/T_{1p}], \quad (8)$$

где t_2 и $D1$ — время регистрации сигнала и задержка для достижения равновесного состояния перед началом серии импульсов в эксперименте NOESY, а T_{1p} — экспериментально измеренное время спин-решеточной релаксации протона p , химический сдвиг сигнала которого соответствовал ω_1 -координате кросс-пика ЯЭО.

Элементы матрицы релаксации \mathbf{R} рассчитывали по координатам протонов, времени корреляции вращения молекулы τ_c и временам спин-решеточной релаксации протонов T_1 как в работах [19, 20]. Для вычисления скоростей кросс-релаксации с участием протонов метильных групп использовали модель быстрых скачков между тремя дискретными состояниями метильной группы в изотропно вращающейся молекуле [21].

Расчет пространственной структуры sB, проведенный в настоящей работе, включал в себя следующие основные этапы:

1. *Анализ локальной структуры* по данным спектроскопии ЯМР. Методика такого анализа отрабатывалась нами ранее на молекулах ВРТИ [22] и I5A [23]. Показано, что, согласовывая полную матрицу релаксации протонов для каждого пептидного фрагмента белка (включающего в себя все атомы аминокислотного остатка, а также группу NH следующего по аминокислотной последовательности остатка) с экспериментальными интенсивностями кросс-пиков ЯЭО, можно определить эффективное время корреляции движения межпротонных векторов i -й пептидной единицы (τ_c^i), диапазоны значений торсионных углов основной цепи (φ_i, ψ_i), а также ротамер боковой цепи (диапазон торсионного угла χ_i^1).

Для определения времени корреляции движения межпротонных векторов i -й пептидной единицы (τ_c^i) его рассматривают как независимый параметр при вычислении штрафной функции $F_r(\tau_c^i)$ (F_r минимизируют по углам φ_i, ψ_i и χ_i^1 пептидной единицы при каждом значении τ_c^i) и выбирают ту величину, которая обеспечивает наилучшее согласование расстояний между протонами в полученной конформации пептидной единицы и расстояний, рассчитанных из интенсивностей кросс-пиков ЯЭО в спектре NOESY. В дальнейшем все времена корреляции движения межпротонных векторов молекулы принимали равными единому времени корреляции вращения молекулы как целого (τ_c) (приближение «жесткой глобулы»).

Используя полученное время τ_c , для каждой пептидной единицы sB строили зависимости $F_r(\varphi, \psi)$ (конформационные карты), позволяющие

вести ограничения на торсионные углы φ и ψ , необходимые для дальнейшего расчета пространственной структуры. Диапазоны значений φ и ψ ограничивали областью конформационной карты, в пределах которой, во-первых, F_r меньше некоторой заданной величины, во-вторых, не нарушаются стерические ограничения, и, в-третьих, угол φ соответствует экспериментальному значению константы спин-спинового взаимодействия протонов $\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H}$ [24].

Возможность реализации одного из трех ротамеров боковых цепей аминокислотных остатков [t ($\chi^1 = 180 \pm 30^\circ$), g^+ ($-60 \pm 30^\circ$), g^- ($60 \pm 30^\circ$)] оценивали путем сравнения найденных для них наименьших значений штрафной функции F_r . Дополнительно для определения конформации боковой цепи использовали интенсивности кросс-пиков $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ в спектрах DQF-COSY (см. «Экспериментальную часть»).

2. *Уточнение конформации боковых цепей и структуры в целом* путем минимизации энергии и поиска структур, согласующихся с межпротонными расстояниями, вычисленными из экспериментальных интенсивностей кросс-пиков ЯЭО. Для конструирования стартовой модели молекулы брали стандартные значения торсионных углов основной цепи ($\varphi = -57^\circ$, $\psi = -47^\circ$ для α -спирали; $\varphi = -120^\circ$, $\psi = 120^\circ$ для развернутой конформации), удовлетворяющие диапазонам торсионных углов φ и ψ , полученным при анализе локальной структуры. Ориентации боковых цепей аминокислотных остатков задавали таким образом, чтобы удовлетворить данным о контактах ЯЭО между протонами боковой цепи данного i -го остатка с протонами $i \pm 3$ -го и $i \pm 4$ -го остатков. Для остатков, не имевших данных о подобных контактах, использовали энергетически выгодный для α -спирали ротамер ($\chi^1 = 180^\circ$ для остатка валина и $\chi^1 = -60^\circ$ для остальных остатков).

Расчет локальной структуры и минимизацию конформационной энергии в пространстве торсионных углов (валентные углы и длины связей фиксированы) проводили по программе CONFORNMR [22, 25]. Для вычисления энергии использовали параметры ECEPP/2 [26, 27], однако электростатическую энергию не учитывали, поскольку основной вклад в нее дают взаимодействия заряженных боковых цепей, величину которых трудно корректно учесть. Для остатков пролина в α -спирали использовали гибкую геометрию, т. е. варьировали углы φ , χ^1 , χ^2 и χ^3 , а длины связей и валентные углы удерживали с помощью квадратичных стягивающих потенциалов.

При уточнении пространственной структуры sB сначала минимизировали энергию стартовой конформации, а затем последовательно рассматривали все возможные ротамеры каждой i -й боковой цепи по углам χ^1 и χ^2 . При этом для каждого ротамера после минимизации энергии рассчитывали интенсивности кросс-пиков ЯЭО по полной матрице релаксации для фрагмента молекулы [$i - 5$; $i + 5$] и соответствующие штрафные функции F_I и F_r . Начальные значения всех торсионных углов, кроме χ^1 и χ^2 рассматриваемой боковой цепи, перед минимизацией соответствовали стартовой структуре sB. Штрафные функции вычисляли только для ЯЭО-контактов протонов рассматриваемой боковой цепи. При выявлении конформации боковой цепи с более низким значением штрафной функции, чем в стартовой модели, изменяли соответствующий угол и процедуру повторяли до тех пор, пока для всех аминокислотных остатков не были выявлены ротамеры боковых цепей с минимальной штрафной функцией, либо, если функции F_I и F_r оказывались близкими для нескольких конформаций, с минимальной энергией.

3. *Минимизацию конформационной энергии* в пространстве координат атомов с вариацией величин валентных углов и связей проводили по потенциалам CHARMM [28]. Соответствие полученных в результате минимизации структур экспериментальным данным оценивали по штрафным функциям F_r и F_I (см. выше), рассчитанным с помощью программы CONFORNMR.

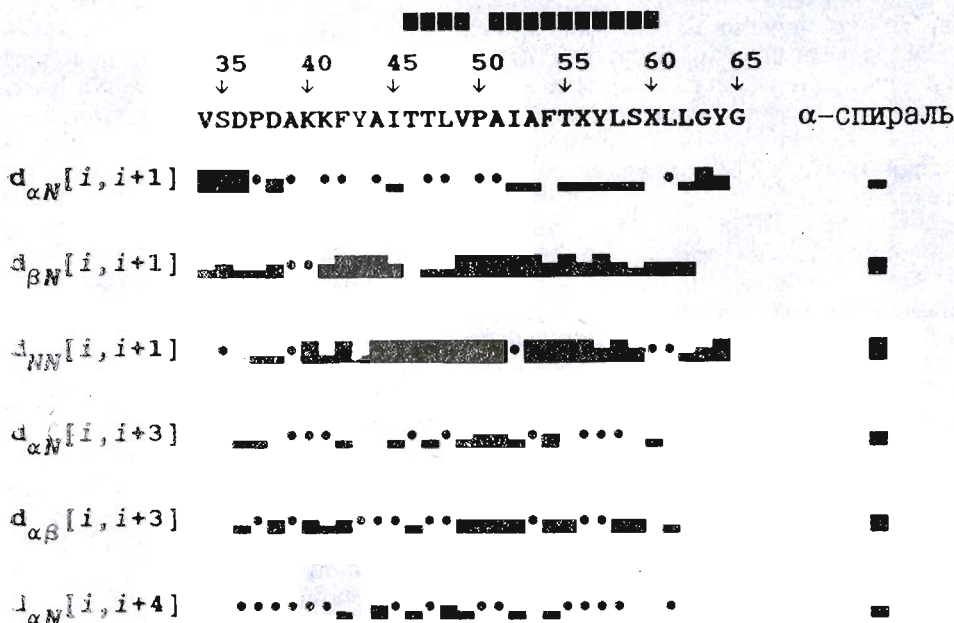


Рис. 1. Аминокислотная последовательность синтетического сегмента В (34 — 65) бактериоопсина и d -связи с участием протонов NH, $C^{\alpha}H$ и $C^{\beta}H$. Использовано однобуквенное обозначение аминокислотных остатков, X — остаток норлейцина. Толщина линий, отвечающих d -связям, характеризует интенсивности (сильные, средние и слабые) соответствующих кросс-пиков ЯЭО в спектре NOESY ($\tau_m = 200$ мс). Кружками отмечены ЯЭО-связи, присутствие которых в спектре NOESY вызывало сомнение. В правой части диаграммы показан набор d -связей, ожидаемых для канонической правой α -спирали. Квадратами над аминокислотной последовательностью обозначены остатки с медленно обменивающимся амидным протоном NH (сигналы от протонов NH наблюдаются в DQF-COSY-спектре 1H -ЯМР, накопленном в период между 56 и 62 ч после растворения образца)

Предварительный анализ данных ЯМР показал [12], что в смеси хлороформ — метанол sB образует на участке Asp-38 — Thr-64 α -спираль, так как наблюдается почти непрерывная последовательность ЯЭО-контактов между протонами i -го и $i + 3$ (4)-го остатков. При этом, судя по скоростям обмена амидных протонов NH на дейтерий растворителя, спираль наиболее стабильна на участке с остатка Phe-42 до остатка Nle-60 (рис. 1).

Изложенная в предыдущем разделе процедура расчета пространственной структуры, основывающаяся на минимизации конформационной энергии с проверкой на соответствие интегральным интенсивностям кросс-пиков ЯЭО, дала следующие результаты.

Результат предварительной оценки τ_c приведен в табл. 1. Времена τ_c^i корреляции движения межпротонных векторов определили лишь для четырех пептидных единиц, для которых зависимость $F_r(\tau_c)$ имеет выраженный минимум в интервале 3—6 нс. Еще для восьми определены диапазоны τ_c^i , в которых F_r принимает минимальное значение. В остальных случаях либо $F_r \equiv 0$, из-за согласования соответствующих расстояний при любом значении τ_c^i , что связано с большой погрешностью измерения объемов кросс-пиков, либо наблюдается убывающая зависимость $F_r(\tau_c^i)$, что объясняется выравниванием интенсивностей кросс-пиков ЯЭО при увеличении τ_c^i . Исходя из данных табл. 1 единое время корреляции вращения молекулы как целого в дальнейших расчетах было принято равным 4 нс.

Конформация основной цепи сегмента В характеризуется диапазонами значений торсионных углов ϕ и ψ , которые по результатам анализа локальной структуры соответствуют низкоэнергетическим областям «R»,

Результаты анализа локальной структуры сегмента В, солибилизованного в смеси хлороформ – метанол (1 : 1), 0,1 LiClO₄ по данным спектроскопии ЯМР

Пептидная единица	Диапазон τ _c , нс *	Область конформационной карты φ—ψ	Ротамер боковой цепи **	Пептидная единица	Диапазон τ _c , нс *	Область конформационной карты φ—ψ	Ротамер боковой цепи **
Val-34	—	B	—	Pro-50	<4	R+B	—
Ser-35	—	B	g ⁺ ; g ⁻	Ala-51	—	—	—
Asp-36	—	B	—	Ile-52	5-6	R	g ⁺
Pro-37	6	Q	—	Ala-53	—	R	—
Asp-38	3	R	g ⁺ ; t	Phe-54	2-5	R	—
Ala-39	—	R	—	Thr-55	5	R+B	—
Lys-40	—	R+B	—	Nle-56	4-6	R	—
Lys-41	—	R+B	—	Tyr-57	—	R	—
Phe-42	—	R+B	—	Leu-58	3-4	R+Q	—
Tyr-43	—	R+B	—	Ser-59	—	R+B	—
Ala-44	—	R+B	—	Nle-60	—	R+B	—
Ile-45	—	R+B	—	Leu-61	<7	R+B	—
Thr-46	<7	R+Q	g ⁺ ; g ⁻	Leu-62	—	R+B	—
Thr-47	—	Q+B	—	Gly-63	—	R+B	—
Leu-48	—	R+B	—	Tyr-64	4-7	Q	—
Val-49	4	R	t	Gly-65	—	—	—

* В тех случаях, когда зависимости времен корреляции движения межпротонных векторов не имели выраженного минимума, приведены диапазоны значений. Для пептидных единиц остатков аланина определение времен корреляции не проводилось.

** Приведены возможные ротамеры по связи C^α—C^β, определенные при анализе локальной структуры без учета интенсивностей кросс-пиков C^αH/C^βH в спектре DQF-COSY.

«B» и «Q» конформационной карты * (табл. 1). Для всех остатков с Pro-37 по Tyr-64 определились области «R» или «Q», что согласуется со сделанным ранее выводом [12] о наличии здесь α-спирали. Для N-концевых остатков Ser-35 и Asp-36 однозначно определилась область «B». По-видимому, на N-концевом участке sB реализуются несколько конформационных состояний, характеризующихся термином «неупорядоченная структура». Для пептидных единиц Ala-51 и Gly-65 из-за наличия лишь одного внутри-остаточного кросс-пика NH/C^αH не удалось определить диапазоны углов φ и ψ. В этом случае рассматривали весь диапазон стерически разрешенных значений торсионных углов основной цепи.

Найденные при анализе локальной структуры области конформационной карты согласуются с вторичной структурой sB, установленной ранее по данным ЯМР [12] и учитывались при конструировании стартовой конформации молекулы на этапе уточнения пространственной структуры путем минимизации конформационной энергии и согласования полученной при этом структуры с данными ЯМР.

Полученная после минимизации энергии конформация основной цепи sB на участке Asp-38 — Val-49 характеризуется величинами торсионных углов φ и ψ, соответствующими структуре, промежуточной между α-спиралью и 3₁₀-спиралью. В такой конформации возможна реализация бифуркационных водородных связей, так как расстояния между атомом кислорода карбонильной группы *i*-го остатка и атомами водорода амидных групп *i* + 3-го (3₁₀-спираль) и *i* + 4-го (α-спираль) остатков различаются всего на 0,15 Å. Конформация участка Ile-45 — Thr-55, интересного наличием остатка Pro-50, показана на рис. 2. Искажения канонической α-спиральной конформации, вызванные присутствием остатка пролина, проявляются главным образом в изломе оси спирали на угол 27° и образовании водородной связи между карбонильной группой остатка

* Область «R» соответствует торсионным углам φ и ψ, встречающимся в α-спирали, «B» — развернутой конформации основной цепи, характерной для β-структуры, а «Q» — «перешейку» между ними.

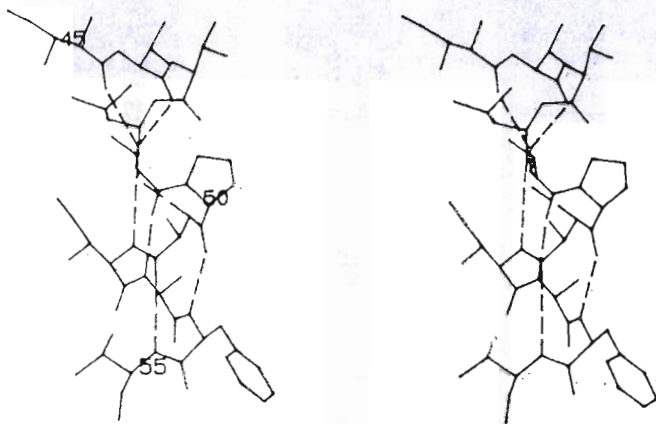


Рис. 2. Конформация участка Ile-45 — Thr-55 сегмента В. Цифрами обозначены остатки Ile-45, Pro-50 и Thr-55. Водородные связи, возможность образования которых подтверждена данными о скоростях обмена амидных протонов NH на дейтерий растворителя, показаны штриховыми линиями

Leu-48 и амидной группой остатка Ala-51. Участок Ile-52—Tyr-64 имеет конформацию основной цепи, близкую к канонической α -спирали.

Определение конформаций боковых цепей аминокислотных остатков проводили независимо на двух этапах расчета: при анализе локальной структуры (учитывали два набора экспериментальных данных — интенсивности кросс-пиков ЯЭО с участием только протонов данной пептидной единицы и интенсивности кросс-пиков $C^\alpha H/C^\beta H$ в спектре DQF-COSY) и при последующей минимизации энергии спирали с перебором конформаций боковых цепей (учитывали интенсивности всех кросс-пиков ЯЭО с участием протонов данного остатка).

При анализе локальной структуры с использованием критерия $\Delta F_r = (F_r - F_r^{\min}) < 0,1$, применявшегося в предыдущих работах [22, 23], однозначно определились ротамеры боковых цепей по связи $C^\alpha - C^\beta$ лишь для двух аминокислотных остатков, а для трех остатков с экспериментальными данными согласуются два ротамера (табл. 1). Еще для девяти аминокислотных остатков (Asp-36, Asp-38, Lys-40, Leu-48, Phe-54, Nle-56, Leu-58, Leu-61 и Tyr-64) интенсивности кросс-пиков $C^\alpha H/C^\beta H$ в спектре DQF-COSY свидетельствуют о наличии преимущественного ротамера боковой цепи, но установить, какого именно, по интенсивностям кросс-пиков ЯЭО в рамках пептидной единицы не удается. По-видимому, такая ситуация обусловлена близостью расстояний между протоном NH-группы и протонами $C^\beta H$ для различных ротамеров боковой цепи, а также спиновой диффузией между β -протонами, приводящей к выравниванию интенсивностей кросс-пиков ЯЭО с их участием. Для пептидных единиц Asp-36, Lys-40, Phe-42, Tyr-43 и Thr-47 соответствие рассчитанных расстояний и полученных из экспериментальных интенсивностей оказалось хуже ($F_r^{\min} = 0,10 - 0,20$, а для Lys-41 $0,3 - 0,35$), чем при модельном расчете для ВРТИ [22]. Это может быть обусловлено как внутримолекулярной подвижностью в sB (например, реализуются несколько конформаций боковых цепей), так и неправильной оценкой погрешностей измерения интенсивностей кросс-пиков ЯЭО.

При расчете локальной структуры диапазоны торсионных углов получились увеличенными для тех пептидных единиц (Ile-45 (угол χ^1), Thr-46 (χ^1), Ile-58 (ϕ, ψ), Ser-59 (ϕ, ψ, χ^1), Nle-60 (ϕ, ψ, χ^1), Leu-61 (ϕ, ψ, χ^1) и Leu-62 (χ^1)), у которых из-за перекрытия сигналов отсутствует информация об интенсивностях некоторых кросс-пиков в спектре NOESY.

Доля остатков sB, для которых удалось однозначно установить доминирующий ротамер боковой цепи (12,5%, не учитывая остатки Gly, Ala и Pro), меньше, чем в случаях модельного расчета для ВРТИ (39%) [22] и I5A (42%) [23]. Это может быть обусловлено как выравниванием

Значения штрафной функции F_r и относительной энергии ΔE для ротамеров боковых цепей сегмента В по результатам энергетической минимизации и перебора конформаций боковых цепей по программе CONFORMMR

Остаток	$F_r, \text{ \AA}^*$			$\Delta E, \text{ ккал/моль}^{2*}$			Возможные ротамеры
	g^+	g^-	t	g^+	g^-	t	
Asp-38 ^{3*}	0,15	0,40	0,19	0,0	3,3	0,7	g^+, t
Lys-40 ^{3*}	0,35	0,31	0,33	1,1	0,9	0,0	g^+, t
Lys-41	0,46	0,54	0,44	0,0	4,2	0,0	g^+, t
Phe-42	0,38	0,65	0,30	3,0	16,7	0,0	t
Tyr-43	2,09	1,09	0,74	4,7	12,5	0,0	t
He-45	0,29	0,38	0,26	0,0	5,2	5,0	g^+
	(0,18	0,59	0,30)				
Thr-46 ^{4*}	0,72	1,07	0,60	0,0	8,6	11,3	g^+, g^-, t
	(0,07	0,09	0,42)				
Thr-47 ^{4*}	0,37	0,30	0,35	0,0	2,5	7,3	g^+, g^-
	(0,14	0,24	0,43)				
Leu-48 ^{3*}	0,19	0,18	0,25	1,0	9,9	0,0	g^+, t
	(0,20	0,32	0,29)				
Val-49	0,60	0,47	0,19	13,6	5,7	0,0	t
He-52	0,18	0,58	0,60	0,0	8,1	9,4	g^+
Phe-54 ^{3*}	0,87	0,42	0,14	3,7	13,9	0,0	t
Thr-55 ^{4*}	0,11	0,68	0,53	0,0	8,4	12,3	g^+
Nle-56 ^{3*}	0,34	0,59	0,50	0,3	5,3	0,0	g^+
Tyr-57	1,38	0,86	0,47	3,1	15,7	0,0	t
Leu-58 ^{3*}	0,32	0,25	0,11	2,3	4,5	0,0	t
Ser-59 ^{4*}	0,05	0,13	0,03	0,0	0,1	0,3	g^+, g^-, t
Nle-60	0,05	0,51	0,06	0,0	10,4	3,7	g^+
Leu-61 ^{3*}	0,31	1,64	0,27	1,5	8,5	0,0	g^+, t
Leu-62	0,13	0,37	0,12	0,0	5,5	1,0	g^+, t
Tyr-64 ^{3*}	0,32	0,49	0,56	0,1	5,6	0,0	g^+

* При рассмотрении каждой i -й боковой цепи в штрафную функцию включались только кросс-пики ЯЭО с участием ее протонов. Минимизация энергии и расчет матрицы релаксации протонов проводились для фрагментов α -спирали $[i-5; i+5]$. В некоторых случаях для сравнения в скобках приведены значения функции F_I .

^{2*} За ноль принимается минимальная в каждом случае энергия ротамера.

^{3*} Судя по интенсивностям кросс-пигов $C^\alpha H/C^\beta H$ в спектре DQF-COSY, один из β -протонов данного остатка находится в ориентации *транс*, а другой — в ориентации *гош* по отношению к α -протону. Следовательно, преимущественно реализуется ротамер g^+ или t .

^{4*} Для остатков Thr-46 и -47 и Ser-59 при определении возможных ротамеров боковой цепи относительная энергия ротамеров не принималась во внимание. Это связано с тем, что при расчете конформационной энергии не учитывается влияние среды и в результате гидроксильным группам боковых цепей этих остатков выгодно образовывать внутримолекулярную водородную связь с карбонильными группами основной цепи α -спирали. В то же время анализ штрафных функций F_r и F_I показывает возможность реализации приведенных в таблице ротамеров.

в ряде случаев населенности ротамеров вокруг связи $C^\alpha-C^\beta$, так и отсутствием информации об интенсивностях некоторых кросс-пигов ЯЭО и влиянием погрешностей измерения интенсивностей.

Использование всего набора кросс-пигов ЯЭО на втором этапе расчета структуры (см. предыдущий раздел) позволило точнее описать конформации боковых цепей аминокислотных остатков. Так, для остатков Tyr-43, Val-49, He-52, Phe-54, Thr-55, Nle-56, Tyr-57 и Leu-58 ротамер по связи $C^\alpha-C^\beta$, преимущественно реализующийся в растворе, определился однозначно, поскольку его функция F_r на 0,2—1 \AA меньше, чем у других ротамеров (табл. 2). Как правило, это означает, что несколько кросс-пигов ЯЭО удовлетворяются лишь в данной конформации.

Для остальных боковых цепей имеет несколько ротамеров, близких по величине функции F_r . В такой ситуации принимали во внимание функцию F_I и детально сравнивали нарушения индивидуальных кросс-пигов ЯЭО в каждой конформации. Так, у остатка He-45 ротамеры g^+ и t близки по величине функции F_r , но функция F_I меньше для ротамера g^+ , который также оптимален энергетически (табл. 2) и, по-видимому, реализуется в растворе.

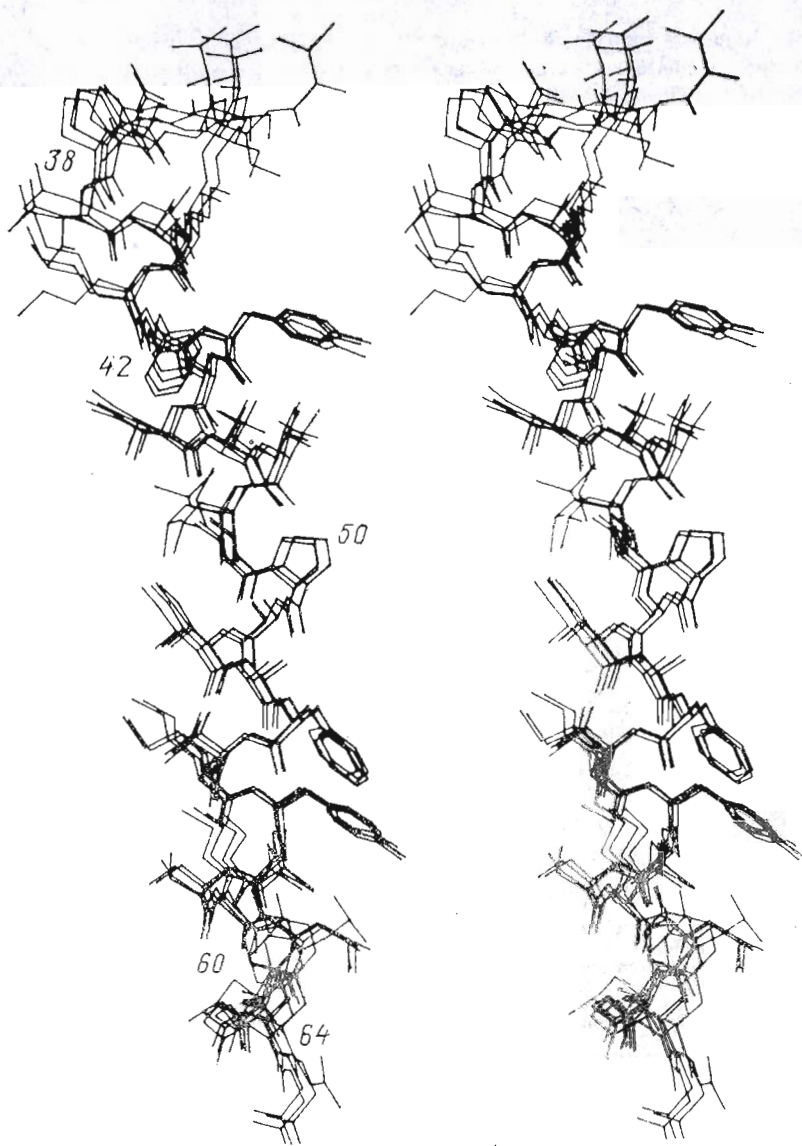


Рис. 3. Стереорепрезентация совмещенных конформаций трансмембранного сегмента В (34—65) бактериоопсина, полученных после энергетической минимизации по программе CHARMM. Конформации совмещены по атомам основной цепи остатков Asp-38 — Tyr-64. Показаны возможные конформации основной цепи на N- и C-ионах пептида, а также боковых цепей аминокислотных остатков (Asp-38, Lys-40, Lys-41, Thr-46, Thr-47, Leu-48, Ser-59, Leu-61 и Leu-62), для которых они не определились однозначно (см. текст). Номерами обозначены остатки, ограничивающие участки: α -спиральной конформации (остатки Asp-38 — Tyr-64) и стабильной части α -спирали (Phe-42 — Nle-60), обозначен также остаток Pro-50, присутствие которого вызывает излом оси спирали

Для остатка Thr-47 ситуация иная: интенсивности части кросс-пиков ЯЭО лучше удовлетворяются в одной, а части — в другой конформации. При этом в g^+ -конформации расчетные интенсивности больше, чем экспериментальные, а в g^- -конформации — меньше. Следовательно, при усреднении конформаций все отклонения должны существенно уменьшиться. Таким образом, в растворе, по-видимому, реализуется равновесная смесь двух (g^+ и g^-) ротамеров боковой цепи Thr-47.

Не удается однозначно определить конформацию боковой цепи остатка Thr-46, поскольку каждому из трех ротамеров (t , g^+ и g^-) удовлетворяет только часть из наблюдаемого набора кросс-пиков ЯЭО. Таким образом, несмотря на более низкую энергию ротамера g^+ , реализуются,

Значения торсионных углов в результирующем наборе * конформаций α -спирального участка сегмента В, солибилизированного в смеси хлороформ – метанол (1 : 1), 0,1 М LiClO₄

Остаток	Значения торсионных углов **							
	ψ	ϕ	χ^1			χ^2		
			t	g^+	g^-	t	g^+	g^-
Pro-37	-52	-34		-32			18	
Asp-38	-66	-39(6)	-178	-68(4)				77(7)
Ala-39	-56	-46(5)						
Lys-40	-64	-42	-176	-66		177		
Lys-41	-57	-48	-178	-62(5)		171		
Phe-42	-57	-46	178			180		
Tyr-43	-56	-42	173					60
Ala-44	-59	-46						
Ile-45	-59	-49		-61				
Thr-46	-59	-45(5)	-177	-56	57			
Thr-47	-61	-33(4)		-60	58			
Leu-48	-69	-28(9)	-156		88	173		56
Val-49	-51	-49	176					
Pro-50	-43	-50		-38			11	
Ala-51	-60	-44						
Ile-52	-58	-46		-58				
Ala-53	-58	-42						
Phe-54	-60	-46	177					82
Thr-55	-59	-50		-56				
Nle-56	-60	-51		-69		180	-61	
Tyr-57	-54	-44(4)	173					81
Leu-58	-61(5)	-53(4)	179					67
Ser-59	-55	-47	-175	-59	56			
Nle-60	-58	-50(5)		-65		170		
Leu-61	-56	-49(6)	-175	-80				52
Leu-62	-56	-45(4)	-177	-79		157		56(7)
Gly-63	-57	-39						
Tyr-64	-65	-47		-58		143		

* Получен после дополнительной энергетической минимизации конформации в пространстве координат атомов по потенциалам CHARMM [21].

** Приведены средние значения углов основной цепи для результирующего набора конформаций. Для каждого ротамера (t , g^+ , g^-) боковых цепей, возможность реализации которого не противоречит данным ЯМР, приведены усредненные значения углов. В скобках указаны максимальные отклонения углов в том случае, если они превышают 3°.

по-видимому, все три ротамера по связи $C^\alpha-C^\beta$. За исключением этих двух случаев (Thr-46 и Thr-47), остальные конформации боковых цепей sB, согласующиеся с ЯЭО-контактами, одновременно характеризуются низкой энергией и удовлетворяют данным о *gauche*- и *trans*-ориентациях β -протонов, полученным из спектров COSY (см. примечание 3 в табл. 2).

Необходимо отметить, что конформации боковых цепей sB, реализующиеся в растворе, в значительной степени обусловлены существующими в α -спирали стерическими ограничениями. При одной из возможных ориентаций атома C^γ , возникающих при вращении вокруг связи $C^\alpha-C^\beta$, он вместе с присоединенными к нему атомами водорода или группами боковой цепи внедряется внутрь α -спирали, тем самым искажая ее. Поэтому для остатков с двумя C^γ -атомами в α -спирали энергетически выгоден только один (t для остатка Val и g^+ для Ile), а для остатков с одним C^γ -атомом — два (t и g^+) из трех возможных ротамеров. Именно эти ротамеры реализуются в α -спиралях глобулярных белков [29] и фотосинтетическом реакционном центре зеленых бактерий [30]. В структуре sB, судя по данным ЯМР, для остатков Val реализуется лишь ротамер t , а для Ile — ротамер g^+ . Анализ величин штрафной функции F_r и конформационной энергии ΔE (табл. 2) для остатков Phe и Tyr, кроме C-концевого Tyr-64, выявил предпочтительность ротамера t . Для остатков Thr за счет образования водородной связи между гидроксильной группой i -го

треонина и карбоксильной группой $i - 4$ -го остатка энергетически выгоден ротамер g^+ .

На этом же этапе была предпринята попытка выявить предпочтительные ротамеры по связям $C^{\beta}-C^{\gamma}$ для 10 остатков Leu, Ile, Nle и Lys. Однако из-за отсутствия достаточного количества однозначно идентифицированных контактов ЯЭО с участием протонов боковых цепей это удалось сделать лишь для четырех остатков: Ile-45 (ротамер t), Ile-52 (t), Leu-58 (g^-) и Nle-60 (t).

Конформации sB, различающиеся ориентациями боковых цепей, возможность реализации которых подтверждена проведенным выше анализом, и минимизированные энергетически в пространстве торсионных углов по программе CONFORNMR, дополнительно минимизировали в пространстве координат атомов (использовали потенциалы CHARMM [21]). Полученный в результате набор структур показан на рис. 3, а торсионные углы участка Asp-38 — Tyr-64 и их отклонения приведены в табл. 3. Среднеквадратичное отклонение (RMSD), рассчитанное попарно для структур из этого набора, не превышает 1,27 Å (среднее RMSD = 0,65 Å) при сравнении по атомам основной цепи (N, C $^{\alpha}$, C $^{\gamma}$) и 1,64 Å (среднее RMSD = 1,05 Å) при сравнении по всем атомам α -спирального участка (остатки 38—64). При сравнении по атомам участка стабильной α -спирали (остатки 42 — 60) соответствующие значения не превышают 0,89 Å (среднее RMSD = 0,43 Å) и 1,26 Å (среднее RMSD = 0,75 Å). Значения штрафных функций F_r и F_l (см. уравнения 1—6), рассчитанные по полному набору кросс-пиков для всех конформаций, не превышают соответственно 0,34 Å и 0,35. При этом для 18 из 274 использованных кросс-пиков ЯЭО ошибка в эффективном расстоянии (см. уравнения 2—4) составляет 0,5—1,0 Å, для 5 — 1,0—1,5 Å, а для остальных — $<0,5$ Å.

Из-за отсутствия достаточного количества кросс-пиков в спектрах NOESY, что, по-видимому, вызвано большой подвижностью, не определена однозначно конформация N-концевых остатков молекулы — с Val-34 по Pro-37 и конформация C-концевого остатка Gly-65. Наибольшие ошибки в расстояниях наблюдаются для кросс-пиков с участием протонов потенциально наиболее подвижных боковых цепей (таких, как Thr-47), а также кросс-пиков типа $i/i + 3$ (4) в ситуации, когда между i -м и $i + 3$, $i + 4$ -м остатками расположен пролин в α -спирали.

Присутствие остатка пролина (Pro-50) в середине α -спирали представляет особый интерес. Он встречается в центре протяженных α -спиральных участков в глобулярных белках [29] и в реакционном центре фотосистемы бактерий [30]. Как известно, пролин дестабилизирует α -спираль, поскольку атомы пролинового кольца наталкиваются на атомы боковой цепи предыдущего остатка. При этом область «R» конформационной карты становится энергетически невыгодной для расположенного перед пролином остатка, а в α -спирали возникает излом приблизительно на 26° [31]. Можно было бы предположить, что энергетически невыгодная структура α -спирали с пролином в середине стабилизируется за счет компактной упаковки α -спирали в белках. Однако проведенный в настоящей работе расчет пространственной структуры, основанный на данных ЯМР, однозначно указывает на то, что и одиночная α -спираль в неполярном окружении не прерывается из-за присутствия пролина. При этом ось α -спирали пептида имеет излом $\approx 27^\circ$, что несколько больше, чем в структуре бактериородопсина, полученной по данным электронной криомикроскопии (20°) [6].

Сравнивая результаты настоящей работы со структурой, полученной с использованием данных электронной криомикроскопии [6], отметим хорошее совпадение конформации основной цепи (α -спираль) на участке Asp-38 — Leu-62. Однако в отличие от полученных нами результатов конформации многих боковых цепей, выявленные в электронно-микроскопической структуре, не выгодны энергетически и практически не встречаются в α -спиралях. Можно предположить, что указанные различия обусловлены не взаимной упаковкой α -спиралей в бактериородопсине, а в основном неточным определением его пространственной структуры

по данным электронной криомикроскопии, поскольку разрешение составляло всего лишь $3,5 \text{ \AA}$ в одном и 10 \AA — в другом направлении [6].

Полученные результаты позволяют оценить достоинства и недостатки использованной методики расчета. Анализ локальной структуры дает возможность корректно обосновать выбор стартовой конформации молекулы при энергетической минимизации. Однако использованная процедура интегрирования кросс-пиков ЯЭО (см. экспериментальную и теоретическую часть) не позволяет с достаточной точностью определять объемы перекрытых кросс-пиков. В результате многие кросс-пики были изъяты из рассмотрения и определение конформеров боковой цепи аминокислотных остатков при анализе локальной структуры оказалось малопродуктивным. Кроме этого в спектрах NOESY при $\tau_m = 200$ мс большое влияние на интенсивность кросс-пиков оказывает спиновая диффузия, что также дает погрешность при определении расстояний [16]. Внутримолекулярная подвижность может проявляться как различия во времени корреляции τ_c для разных пар протонов, причем для одиночной α -спирали, имеющей цилиндрическую форму (см. рис. 3), τ_c может быть существенно анизотропным. В результате при использовании модели «жесткой глобулы» с единым для всех пар протонов временем корреляции τ_c непосредственная минимизация штрафной функции (F_T , F_I или аналогичной) может привести к образованию далеких от реальности энергетически напряженных конформаций. Используемая в настоящей работе схема уточнения пространственной структуры, при которой минимизируется только конформационная энергия, а затем анализируются штрафные функции, позволяет избежать этого даже в случае высокой внутримолекулярной подвижности.

Заключение

Расчет конформации сегмента В бактериородопсина, солюбилизованного в смеси хлороформ — метанол (1 : 1), 0,1 М LiClO_4 , на основе интегральных интенсивностей кросс-пиков в спектрах NOESY показал, что пептид имеет α -спиральную конформацию практически на всем своем протяжении — от остатка Asp-38 до Tyr-64. Присутствие остатка Pro-50 в центре α -спирали обуславливает ее излом на угол 27° . Для наиболее стабильного участка α -спирали (остатки 42 — 60) однозначно определена конформация 72% боковых цепей. На менее стабильных участках α -спирали (остатки 38 — 41 и 61 — 64) анализ показал возможность реализации нескольких конформаций боковых цепей. Это хорошо согласуется с повышенной скоростью дейтерообмена амидных групп NH на этих участках (см. рис. 1). На N-конце молекулы α -спираль прерывается остатком Pro-37, и конформацию участка Val-34 — Asp-36 можно охарактеризовать как «неупорядоченную структуру». Это позволяет предположить двухстадийный механизм дестабилизации α -спирали в изотропной среде смеси органических растворителей. Первоначально увеличивается подвижность боковых радикалов остатков при высокой вероятности α -спиральной конформации основной цепи. Затем возникают неспиральные конформации основной цепи («неупорядоченная структура» на участке Val-34 — Asp-36).

Экспериментальная часть

Спектры ^1H -ЯМР и отнесение в них сигналов протонов взяты из работы [12].

Интегральные интенсивности (объемы) кросс-пиков в двумерных спектрах ЯЭО (NOESY) измеряли интегрированием в заданном прямоугольнике при помощи стандартной процедуры программы DISR88 (Bruker, ФРГ). Были измерены интенсивности 274 кросс-пиков в спектре NOESY (время обмена компонент намагниченности $\tau_m = 200$ мс).

Времена неселективной спин-решеточной релаксации (T_1), протонов измеряли с помощью метода «инверсия-восстановление» [32]. Задержка

для восстановления равновесной намагниченности равнялась 5 с. Поскольку ошибка во временах T_1 незначительно сказывается на расчетных интенсивностях кросс-пиков ЯЭО [19], для всех протонов использовали характерные средние времена T_1 : 0,75 с для протонов NH, 0,6 с для α , β , γ и δ -протонов и 1,3 с для ароматических протонов.

гош- и *транс*-Ориентации β -протонов по отношению к α -протонам определяли по интенсивностям кросс-пиков $C^\alpha H/C^\beta H$ в спектрах DQF-COSY. Протон $C^\beta H$, находящийся в *транс*-ориентации, имеет большую (≥ 10 Гц) константу спин-спинового взаимодействия с протоном $C^\alpha H$ и, как следствие, большую интенсивность кросс-пика $C^\alpha H/C^\beta H$. Указанным методом определена ориентация β -протонов для девяти остатков: Asp-38, Lys-40, Leu-48, Phe-54, Ile-56, Leu-58, Leu-61, Leu-62 и Tyr-64.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ovchinnikov Yu. A. // FEBS lett. 1982. V. 148. P. 179—191.
2. Khorana H. G. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. P. 7439—7442.
3. Ovchinnikov Yu. A., Abdulaev N. G., Feigina M. Yu., Kiselev A. V., Lobanov N. A. // FEBS lett. 1979. V. 100. P. 219—244.
4. Khorana H. G., Gerber G. E., Herlihy W. C., Gray C. P., Anderegg R. J., Nihei K., Biemann K. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 5046—5050.
5. Bayley H., Huang K.-S., Radhakrishnan R., Ross A. H., Takagaki Y., Khorana H. G. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 2225—2229.
6. Henderson R., Baldwin J. M., Ceska T. A., Zemlin F., Beckmann E., Downing K. H. // J. Mol. Biol. 1990. V. 213. P. 899—929.
7. Wuthrich K. NMR of Proteins and Nucleic Acids. N.Y.: Willey, 1986.
8. Arseniev A. S., Kuryatov A. B., Tsetlin V. I., Bystrov V. F., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. // FEBS lett. 1987. V. 213. P. 283—288.
9. Абдулаева Г. В., Соболев А. Г., Арсеньев А. С., Цетлин В. И., Быстров В. Ф. // Биол. мембраны. 1991. Т. 8. № 1. С. 30—43.
10. Barsukov I. L., Abdulaeva G. V., Arseniev A. S., Bystrov V. F. // Eur. J. Biochem. 1990. V. 192. P. 321—327.
11. Sobol A. G., Arseniev A. S., Abdulaeva G. V., Musina L. Yu., Bystrov V. F. // J. Biomol. NMR. 1991. In Press.
12. Arseniev A. S., Maslennikov I. V., Kozhich A. T., Bystrov V. F., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. // FEBS Lett. 1988. V. 231. P. 81—88.
13. Масленников И. В., Арсеньев А. С., Чикин Л. Д., Кожич А. Т., Быстров В. Ф., Иванов В. Т. // Биол. мембраны. 1991. Т. 8. № 2. С. 156—160.
14. Масленников И. В., Арсеньев А. С., Кожич А. Т., Быстров В. Ф., Иванов В. Т. // Биол. мембраны. 1990. Т. 7. № 3. С. 222—229.
15. Pervushin K. V., Arseniev A. S., Kozhich A. T., Ivanov V. T. // J. Biomol. NMR, 1991. In Press.
16. Keepers J. W., James T. L. // J. Magn. Reson. 1984. V. 57. № 3. P. 404—426.
17. Bodenhausen G., Ernst R. R. // J. Amer. Chem. Soc. 1982. V. 104. № 5. P. 1304—1309.
18. Bremner J., Mendz G. L., Moore W. J. // J. Amer. Chem. Soc. 1984. V. 106. № 17. P. 4691—4696.
19. Соболев А. Г., Арсеньев А. С. // Биоорганич. химия. 1988. Т. 14. № 8. С. 997—1013.
20. Kalk A., Berendsen H. J. C. // J. Magn. Reson. 1976. V. 24. № 3. P. 343—366.
21. Tropp J. // J. Chem. Phys. 1980. V. 72. № 11. P. 6035—6043.
22. Ломизе А. Л., Соболев А. Г., Арсеньев А. С. // Биоорганич. химия. 1990. Т. 16. № 2. С. 179—201.
23. Ломизе А. Л., Арсеньев А. С., Масленников И. В., Быстров В. Ф. // Биоорганич. химия. 1990. Т. 16. № 10. С. 1310—1324.
24. Bystrov V. F. // Progr. NMR Spectrosc. 1976. V. 10. P. 41—81.
25. Арсеньев А. С., Ломизе А. Л., Барсуков И. Л., Быстров В. Ф. // Биол. мембраны. 1986. Т. 3. № 11. С. 1077—1104.
26. Motany F. A., McGuire R. F., Burgess A. W., Scheraga H. A. // J. Phys. Chem. 1975. V. 79. № 22. P. 2361—2381.
27. Nemethy G., Pottle M. S., Scheraga H. A. // J. Phys. Chem. 1983. V. 87. № 11. P. 1883—1887.
28. Brooks B. R., Bruccoleri R. E., Olafson B. D., States D. J., Swaminathan S., Karplus M. // J. Comput. Chem. 1983. V. 4. P. 187—217.
29. Barlow D. J., Thornton J. M. // J. Mol. Biol. 1988. V. 201. P. 601—619.
30. Deisenhofer J., Epp O., Miki K., Huber R., Michel H. // Nature. 1985. V. 318. P. 618—624.
31. Richardson J. S., Richardson D. S. // Principles and Patterns of Protein Conformation, in Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation / Ed. G. D. Fasman. N.Y.: Plenum Press, 1989. P. 1—98.
32. McDonald G. G., Leigh J. S. // J. Magn. Reson. 1973. V. 9. № 3. P. 358—362.

Поступила в редакцию
30.IV.1991

STRUCTURE REFINEMENT OF (34—65) BACTERIOOPSIN FROM NMR
DATA IN SOLUTION

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

The spatial structure of a synthetic peptide, an analogue of the membrane spanning segment B (residues 34—65) of bacterioopsin from *Halobacterium halobium*, has been refined. Backbone torsion angles were derived from intensities of short-range interproton NOEs. These, together with a complete set of the NOEs integral intensities formed the basis for the three-dimensional structure refinement by the energy minimization with consideration of NOE penalty functions. Analysis indicates the right-handed α -helical conformation of segment B extending from Asp-38 to Tyr-64 with a kink of the helical axis (27°) at Pro-50. The most stable region with an average root-mean-square deviation of 0.43 Å between the backbone atoms includes residues 42—60 in six energy refined structures. The N-terminal part of segment B (residues 34—37) has no ordered conformation. The inferred structure is in close agreement with the electron cryomicroscopy structure of bacteriorhodopsin, differing from it in conformations of most of the side chains.