



УДК 547.964.4:543.422.25:577.322.5

© 1992 г.

А. Л. Ложизе, В. Ю. Орехов, А. С. Арсеньев

УТОЧНЕНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ИОННОГО
КАНАЛА ГРАМИЦИДИНА А

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина РАН, Москва

Проведено уточнение пространственного строения ионного канала грамицидина А (ГА) на основе объемов кросс-пиков ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО), измеренных в спектрах NOESY (при временах обмена компонент намагниченности $\tau_m=100$ и 200 мс) для ГА, встроенного в мицеллы SDS в H_2O и 2H_2O . Конформация правой $\pi_{LD}^{6,3} \leftarrow 6,3$ -спирали грамицидина А, реконструированная нами ранее по данным спектроскопии 1H -ЯМР, удовлетворительно согласуется с объемами кросс-пиков ЯЭО. Среднеквадратичная величина отклонений межпротонных расстояний в этой конформации от расстояний, оцененных по соотношению экспериментальных и теоретических (рассчитанных по полной матрице релаксации протонов) объемов кросс-пиков ЯЭО, варьирует от 0,2 до 0,5 Å в зависимости от спектра. Однако для некоторых кросс-пиков ЯЭО, в основном образованных протонами боковых цепей, нарушения соответствующих расстояний составляют 0,5–2,0 Å. Часть этих нарушений объясняется тем, что в мицеллах SDS одновременно реализуется несколько низкоэнергетических конформаций ГА, отличающихся величиной торсионных углов χ^1 остатка $L\text{-Val}^7$ и χ^2 остатков $D\text{-Leu}^4$, $D\text{-Leu}^{10}$ и $D\text{-Leu}^{12}$. Переходы между этими конформациями сопровождаются изменением ориентации пептидных групп, образующих ионный канал, что объясняет дисперсию ионной проводимости канала. Остальные нарушения, по-видимому, также обусловлены внутримолекулярной подвижностью ГА и, частично, погрешностью измерения объемов кросс-пиков в спектрах NOESY.

Введение

Грамицидин А — линейный пентадекапептид, состоящий из чередующихся L - и D -аминокислотных остатков ($HCO\text{-}L\text{-Val}^1\text{-Gly}^2\text{-}L\text{-Ala}^3\text{-}D\text{-Leu}^4\text{-}L\text{-Ala}^5\text{-}D\text{-Val}^6\text{-}L\text{-Val}^7\text{-}D\text{-Val}^8\text{-}L\text{-Trp}^9\text{-}D\text{-Leu}^{10}\text{-}L\text{-Trp}^{11}\text{-}D\text{-Leu}^{12}\text{-}L\text{-Trp}^{13}\text{-}D\text{-Leu}^{14}\text{-}L\text{-Trp}^{15}\text{-NH}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$) *. В мембранах ГА образует каналы, проницаемые для моновалентных катионов. Пространственная структура ГА, встроенного в мицеллы SDS, моделирующие среду биологических мембран, исследована при помощи двумерной 1H -ЯМР-спектроскопии [1]. Полученные данные ЯМР включали в себя набор кросс-пиков ЯЭО, константы спин-спинового взаимодействия (KCCB) протонов $H\text{-NC}^\alpha\text{-H}$ и $H\text{-C}^\alpha\text{C}^\beta\text{-H}$ и скорости обмена протонов амидных групп с растворителем. По совокупности этих данных установлено, что ГА образует димер, состоящий из двух правых односторонних π_{LD} -спиралей с 6,3 остатка на виток, ассоциированных по типу N-конец к N-концу (правая $\pi_{LD}^{6,3} \leftarrow 6,3$ -спираль) [1].

В дальнейшем нами был проведен расчет пространственной структуры димера ГА [2], при котором рассматривался набор конформаций правой

Сокращения, использованные в статье: ГА — грамицидин А, ЯЭО — ядерный эффект Оверхаузера, NOESY — двумерный спектр ядерного эффекта Оверхаузера, SDS — додецилсульфат натрия.

* Далее для L -аминокислот конформационный символ опущен.

$\xrightarrow{6,3} \xleftarrow{6,3}$
 $\pi_{LD} \pi_{LD}$ - спирали, отличающихся друг от друга ориентациями боковых цепей. Каждая конформация оптимизировалась энергетически, а затем сравнивалась с данными ЯМР [2]. При этом кросс-пики ЯЭО классифицировались на три типа путем визуальной оценки их интенсивностей и соответственно вводились три типа ограничений на расстояния между протонами. В результате оказалось, что ряд конформаций боковых цепей D-Leu, Val⁷ и C-концевой этаноламинной группы в одинаковой степени согласуется с экспериментальными данными [2]. В настоящей работе предпринята попытка уточнить полученную ранее [2] структуру ГА путем количественного согласования объемов кросс-пигов ЯЭО, измеренных в спектрах NOESY и рассчитанных по полной матрице релаксации протонов ГА.

Теоретическая часть

Объемы кросс-пигов ЯЭО в спектрах NOESY ГА рассчитывали с учетом взаимодействия всех протонов в системе [3]:

$$V(\tau_m) = \exp(-R\tau_m)V^0 = D \exp(-\Lambda\tau_m)D^{-1}V^0, \quad (1)$$

где τ_m — время обмена компонент намагниченности; $V(\tau_m)$ — матрица объемов кросс-пигов ЯЭО; R — матрица релаксации; D — матрица собственных векторов матрицы R ; Λ — диагональная матрица, содержащая собственные значения матрицы R ; V^0 — диагональная матрица, описывающая состояние спиновой системы перед началом импульсной последовательности NOESY. При расчете объемов кросс-пигов ЯЭО спектров NOESY ГА, солюбилизованного в мицеллах SDS- d_{25} в $^2\text{H}_2\text{O}$, протоны NH были исключены из рассмотрения, поскольку все они замещены на дейтерий. Для учета неравновесности исходного состояния системы спинов элементов диагональной матрицы V^0 вычисляли по формуле [4]

$$v_{pp} = 1 - \exp[-(t_2 + D1)/T_{1p}], \quad (2)$$

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 неселективной спинрешеточной релаксации протона p.

Элементы матрицы релаксации R рассчитывали по координатам протонов, времени корреляции вращения молекулы τ_c и временам спин-решеточной релаксации протонов T_1 как в работах [4, 5]. Для вычисления скоростей кросс-релаксации с участием протонов метильных групп использовали модель быстрых скачков между тремя дискретными состояниями в изотропно вращающейся молекуле [6]. Для экономии счетного времени при диагонализации матрицы R рассматривали только одну из двух симметричных молекул ГА в димере, т. е. не учитывали уход намагниченности с одной молекулы на другую, поскольку предварительные расчеты показали, что объемы кросс-пигов ЯЭО в спектрах NOESY ГА, рассчитанные для мономера и димера, различаются менее чем на 2%. Повидимому, это связано с тем, что область контакта двух молекул ГА в

$\xrightarrow{6,3} \xleftarrow{6,3}$
 $\pi_{LD} \pi_{LD}$ - спирали невелика и симметрична.

В случае динамического усреднения нескольких конформаций ГА предполагалось, что скорость кросс-релаксации протонов p и q (σ_{pq}) пропорциональна $\langle r_{pq}^{-3} \rangle^2$ при «быстром» обмене усредняемых конформаций, когда время жизни конформации $\tau \ll \tau_c$, или $\langle r_{pq}^{-6} \rangle$ при «медленном» обмене, когда $\tau \gg \tau_c$ (угловые скобки означают усреднение расстояния r_{pq} между протонами p и q, по конформациям в соответствии с их статистическими весами) [7].

Соответствие конформаций ГА экспериментальным данным ЯМР оценивалось путем вычисления штрафных функций F^o и F^r . Первая из них представляет собой среднее отклонение теоретических и экспериментальных объемов кросс-пиков ЯЭО (V_k^{clc} и V_k^{obs}), а вторая — среднеквадратичное отклонение эффективных межпротонных расстояний в данной конформации ($r_k^{эф}$) от расстояний, оцененных по объемам V_k^{clc} и V_k^{obs} :

$$F^V = 1/N \sum_{k=1}^N \begin{cases} |V_k^{obs} - V_k^{clc}| - \Delta V_k, & \text{если } |V_k^{obs} - V_k^{clc}| > \Delta V_k \\ 0, & \text{если } |V_k^{obs} - V_k^{clc}| \leq \Delta V_k \end{cases} \quad (3)$$

где N — число кросс-пиков ЯЭО, а V_k^{obs} и V_k^{clc} — их объемы, нормированные на средний объем в соответствующем спектре NOESY, а ΔV_k — погрешность измерения объема k -го кросс-пика, оцененная следующим образом:

$$\Delta V_k = \max \{ \Delta V_1, \Delta V_2 V_k^{obs} \}, \quad (4)$$

где ΔV_1 — абсолютная ошибка, соответствующая уровню шума в спектре NOESY, а ΔV_2 — относительная ошибка измерения объема кросс-пика (при расчете ΔV , принималась равной 0,1, а $\Delta V_2 = 0,2$). При вычислении функции F^o можно учесть и отсутствие кросс-пиков ЯЭО в спектре NOESY. В этом случае $V_k^{obs} = 0$, а $\Delta V_k = \Delta V_1$.

Многие объемы V_k^{obs} представляют собой сумму вкладов пар протонов p и q , химические сдвиги которых соответствуют данному (k -му) кросс-пику ЯЭО в спектре NOESY. Поэтому каждый теоретический объем V_k^{clc} в уравнении (3) вычисляется как сумма соответствующих элементов v_{pq} матрицы $V(\tau_m)$ (см. уравнение (1)). По этой же причине при сопоставлении расстояний, оцененных по объемам кросс-пиков ЯЭО, и расстояний между протонами в данной конформации вместо индивидуальных расстояний r_{pq} нужно использовать эффективные расстояния $r_k^{эф}$:

$$r_k^{эф} = \left(\sum_{p,q} r_{pq}^{-6} \right)^{-1/6}. \quad (5)$$

Экспериментально измеренному объему кросс-пика ЯЭО $V_k^{obs} \pm \Delta V_k$ соответствует интервал эффективных расстояний $[r_k^{эф-}, r_k^{эф+}]$:

$$\begin{aligned} r_k^{эф+} &= r_k^{эф} [V_k^{clc} / (V_k^{obs} - \Delta V_k)]^{1/6}, \\ r_k^{эф-} &= r_k^{эф} [V_k^{clc} / (V_k^{obs} + \Delta V_k)]^{1/6}. \end{aligned} \quad (6)$$

Расстояние $r_k^{эф}$, наблюдаемое в данной конформации, может выходить за предел интервала $[r_k^{эф-}, r_k^{эф+}]$. Тогда ошибка в расстоянии $\Delta r_k^{эф}$ и штрафная функция F^r определяются следующим образом:

$$\Delta r_k^{эф} = \begin{cases} 0, & \text{если } r_k^{эф+} \geq r_k^{эф} \geq r_k^{эф-}, \\ r_k^{эф} - r_k^{эф+}, & \text{если } r_k^{эф} \geq r_k^{эф+}, \\ r_k^{эф} - r_k^{эф-}, & \text{если } r_k^{эф} < r_k^{эф-}, \end{cases} \quad (7)$$

$$F^r = \left[1/N \sum_{k=1}^N (\Delta r_k^{эф})^2 \right]^{1/2}. \quad (8)$$

Функции F^v и F^r зависят от стереохимического отнесения сигналов метильных групп (в боковых цепях остатков валина и лейцина) и метиленовых протонов (в группах CH_2 остатков триптофана, лейцина и Gly). Поэтому в соответствии с алгоритмом, реализованным в программе CONFORNMR [2], сначала определяется стереохимическое отнесение β -протонов по КССВ $\text{H} - \text{C}^\alpha\text{C}^\beta - \text{H}$, а затем вычисляются функции F^v и F^r при всех возможных вариантах стереохимического отнесения и выбирается такой вариант, при котором функции минимальны. При вычислении функций F^v и F^r для набора кросс-пиков, измеренных в нескольких спектрах NOESY, нормировка объемов проводилась для каждого спектра в отдельности, а вариант стереохимического отнесения выбирался оптимальный для совокупности спектров.

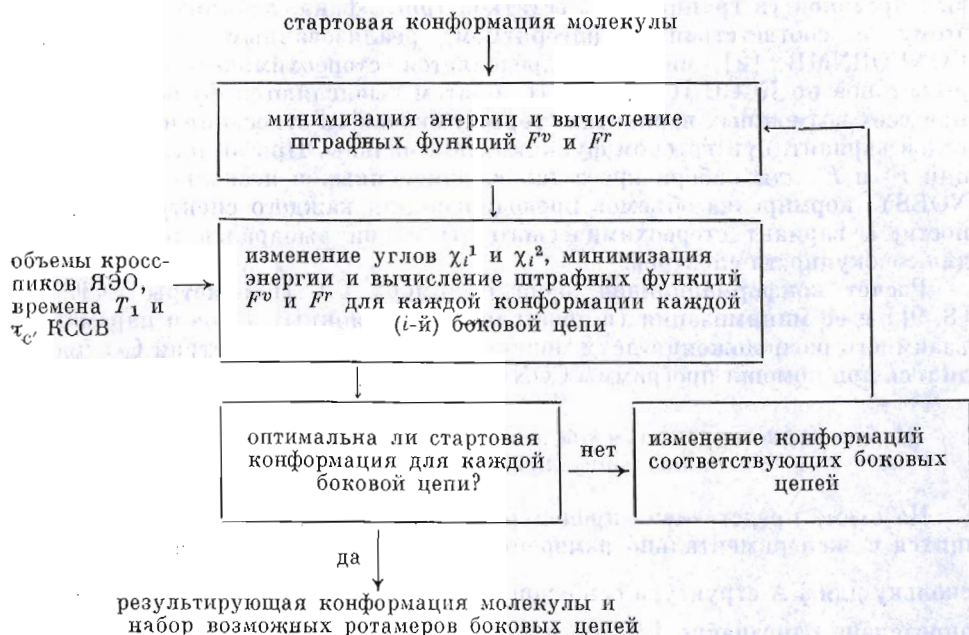
Расчет конформационной энергии димера ГА (параметры ЕСЕРР/2 [8, 9]) и ее минимизация (в пространстве торсионных углов и параметров взаимного расположения двух молекул ГА с учетом симметрии C_2) проводилась при помощи программы CONFORNMR [2].

Набор низкоэнергетических конформаций ГА, согласующихся с интенсивностями кросс-пиков ЯЭО

На схеме представлена процедура поиска конформаций ГА, согласующихся с экспериментально измеренными объемами кросс-пиков ЯЭО. Поскольку для ГА структура основной цепи (правая $\overleftarrow{\text{P}}_{\text{LD}}^{6,3} \overleftarrow{\text{P}}_{\text{LD}}^{6,3}$ -спираль) была определена однозначно [2], то эта процедура включала в себя минимизацию энергии конформаций димера, различающихся значениями торсионных углов боковых цепей χ^1 и χ^2 , и выбор оптимальных из них, характеризующихся наименьшими значениями штрафных функций F^r и F^v (см. «Теоретическую часть»). Поиск начинается с выбора стартовой структуры $\overleftarrow{\text{P}}_{\text{LD}}^{6,3} \overleftarrow{\text{P}}_{\text{LD}}^{6,3}$ -спирали. В этой структуре каждая боковая цепь имеет определенную конформацию (t , g^+ или g^-) относительно связей $\text{C}^\alpha - \text{C}^\beta$ и $\text{C}^\beta - \text{C}^\gamma$ в зависимости от значений торсионных углов χ^1 и χ^2 ($g^+ - \chi = -60 \pm 30^\circ$, $g^- - \chi = 60 \pm 30^\circ$, $t - \chi = 180 \pm 30^\circ$). После минимизации энергии стартовая структура характеризуется определенными значениями штрафных функций F^r и энергии E_0 . Затем для каждой (i -й) боковой цепи рассматриваются альтернативные конформации (ротамеры). С этой целью торсионным углам χ_i^1 и χ_i^2 данной боковой цепи присваиваются стандартные начальные значения (в большинстве случаев близкие к -60 , 60 и 180°), соответствующие каждому j -му ротамеру (а начальные значения остальных углов соответствуют стартовой структуре), после чего минимизируется энергия молекулы и рассчитывается штрафная функция $F_i^r(j)$. При этом учитываются только контакты ЯЭО с участием протонов i -го остатка. После расчета всех значений $F_i^r(j)$ и $E_i(j)$ выбирается оптимальный ротамер каждой боковой цепи (с номером k_i), характеризующийся наименьшей штрафной функцией: $F_i^r(k_i) = \min \{F_i^r(1), F_i^r(2), \dots, F_i^r(n_i)\}$. Для тех остатков, где этот ротамер не соответствует стартовой структуре, т. е. $F_i^r(k_i) < F^r$, вместо стартовых значений торсионных углов χ_i^1 и χ_i^2 выбираются значения, соответствующие ротамеру k_i , и вся процедура повторяется снова.

Отличительной особенностью описанной методики расчета является то, что экспериментальные ограничения не включаются непосредственно в минимизируемую функцию. Вместо этого генерируется набор конформаций

Блок-схема поиска низкоэнергетических конформаций, согласующихся с экспериментально измеренными объемами кросс-пиков ЯЭО



молекулы, соответствующих локальным минимумам потенциальной энергии, и выбираются те из них, которые лучше согласуются с экспериментальными данными. Такой подход позволяет анализировать «противоречивые» кросс-пики ЯЭО, часть которых лучше удовлетворяется в одной, а часть — в другой конформации молекулы. Перебор ротамеров проводится для каждой боковой цепи в отдельности, хотя ориентации сближенных в пространстве боковых цепей могут оказаться взаимосвязанными из-за наличия кросс-пиков ЯЭО между ними. Однако большинство кросс-пиков ЯЭО образовано протонами боковых и основной цепи и, следовательно, их объемы зависят от ориентации только одной боковой цепи. В результате после нескольких циклов описанной процедуры можно получить оптимальную структуру молекулы, в дальнейшем называемую «базовой», а также набор возможных ротамеров каждой боковой цепи, характеризующихся относительно малой величиной штрафной функции и конформационной энергии.

Именно такая методика применялась нами в предыдущей работе по реконструкции пространственной структуры ионного канала ГА [2], с той лишь разницей, что при вычислении штрафной функции вместо объемов кросс-пиков ЯЭО использовались приближенные ограничения на расстояния между протонами (3,2, 3,8 и 4,3 Å для кросс-пиков высокой, средней и низкой интенсивности соответственно). В результате была получена оптимальная «базовая» структура ГА, которую мы используем в качестве стартовой в настоящей работе. Кроме того, удалось однозначно установить конформации боковых цепей остатков триптофана, а также Val¹, D-Val⁶ и D-Val⁵ [2]. В то же время для боковых цепей остатков D-Leu и Val⁷ имелось несколько конформаций, удовлетворяющих ограничениям на расстояния и КССВ протонов Н — C^αC^β — Н [2]. Теперь для каждой из этих конформаций, используя объемы кросс-пиков ЯЭО, измеренные в спектрах NOESY, можно вычислить изменение штрафной функции F^r по сравнению с «базовой» структурой ГА. Соответствующие диаграммы ΔE (относитель-

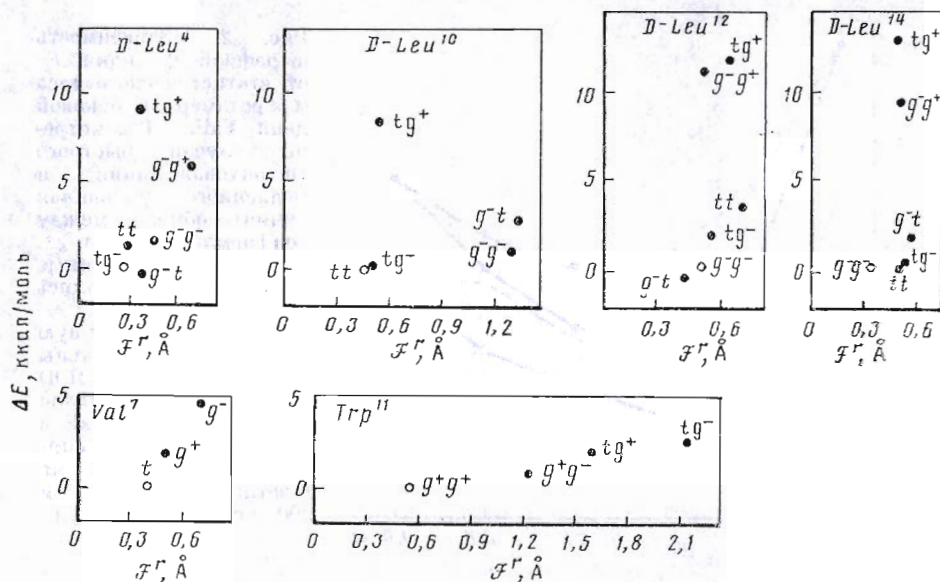


Рис. 1. Соотношение энергии и штрафной функции F^r для конформаций остатков Val⁷, D-Leu^{4, 10, 12, 14} и Trp¹¹. Крестиком обозначена «базовая» конформация, черными кружками — конформации, отличающиеся от «базовой» только ориентацией боковой цепи соответствующего остатка. Значения торсионных углов χ^1 и χ^2 указаны символами g^+ ($\chi = -60 \pm 30^\circ$), g^- ($\chi = 60 \pm 30^\circ$) или t ($\chi = 180 \pm 30^\circ$). Для остатков D-Leu ротамеры g^+ ($\chi^1 = -60^\circ$) не рассматривались, так как они противоречат экспериментальным значениям КССВ протонов Н-С^αС^β-Н и имеют высокую относительную энергию [2]. Штрафная функция F^r вычислялась для совокупности четырех спектров NOESY ГА, встроенного в мицеллы SDS-*d*₂₅ в H₂O и ²H₂O при τ_m 100 и 200 мс. Учитывались только кросс-пики ЯЭО рассматриваемого аминокислотного остатка

ная энергия) — F^r для ротамеров боковых цепей остатков D-Leu и Val⁷ приведены на рис. 1. Каждый ротамер на диаграмме обозначен точкой и парой букв (t , g^- или g^+), первая из которых соответствует углу χ^1 , а вторая — χ^2 .

Относительная энергия и функция F^r для ротамеров боковых цепей ГА хорошо коррелируют (см. рис. 1), т. е. экспериментальным данным лучше удовлетворяют ротамеры с наименьшей энергией. Ротамер «базовой» конформации ГА для всех остатков, кроме D-Leu¹², оптимален как энергетически, так и по величине функции F^r (рис. 1). Исключение представляет остаток D-Leu¹², для которого более предпочтителен ротамер g^-t , отличающийся от «базового» g^-g^- величиной угла χ^2 .

Для всех остатков D-Leu КССВ Н-С^αС^β-Н одного из β-протонов меньше 5, а другого — больше 10 Гц [2]. Следовательно, каждый остаток D-Leu имеет предпочтительный ротамер t или g^- по углу χ^1 . Судя по диаграмме $\Delta E - F^r$ (рис. 1), для остатков D-Leu⁴ и D-Leu¹⁰ предпочтителен ротамер t , а для D-Leu¹² и D-Leu¹⁴ — ротамер g^- . При этом различия в величине функции F^r между ротамерами t и g^- (по углу χ^1) для всех остатков лейцина (кроме D-Leu¹⁰) гораздо меньше, чем для остатков триптофана, где только одна конформация хорошо согласуется с объемами кросс-пигов ЯЭО (в качестве примера на рис. 1 приведен Trp¹¹). Однако следует иметь в виду, что функция F^r — это среднеквадратичная величина Δr для большого числа кросс-пигов ЯЭО данного остатка и поэтому ее увеличение на 0,1–0,2 Å может означать существенное нарушение объемов нескольких кросс-пигов ЯЭО. Так, например, незначительное (на 0,3 Å) преимущество конформации g^-g^- остатка D-Leu¹⁴ по сравнению с tt (рис. 1) объясняется

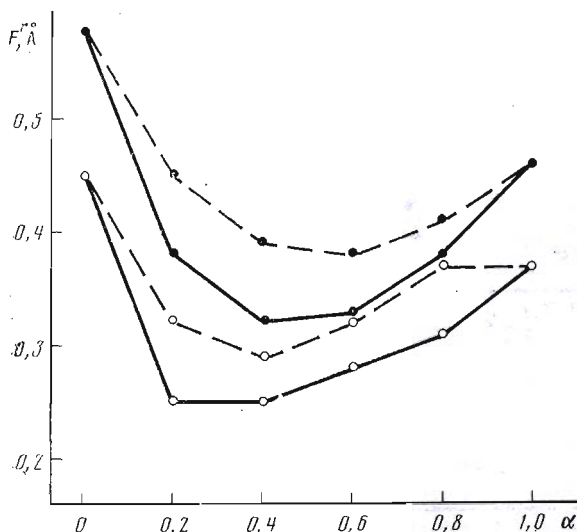


Рис. 2. Зависимость штрафной функции F^r от статистического веса α ротамера t боковой цепи Val⁷. Рассмотрены случаи быстрого (штриховая линия) и медленного (сплошная линия) обмена между конформациями t и g^+ , когда межпротонные расстояния усреднялись соответственно как $\langle r^{-3} \rangle^2$ и $\langle r^{-6} \rangle$. В штрафную функцию включены только кросс-пики ЯЭО с участием сигналов протонов остатка Val⁷ в спектрах NOESY, снятых при τ_m 100 мс (светлые кружки) и 200 мс (темные кружки)

тем, что нарушения Δr кросс-пиков ЯЭО ($\text{H}^{82} \text{Trp}^{13}/\text{C}^{61} \text{H}_3 \text{D-Leu}^{14}$, $\text{H}^{82} \text{D-Leu}^{14}/\text{C}^4 \text{H Trp}^{15}$ и $\text{H}^{82} \text{D-Leu}^{14}/\text{C}^6 \text{H Trp}^{15}$) в ней составляют соответственно $-0,5$, $0,0$ и $0,1$ Å, тогда как в конформации tt — соответственно $-1,3$, $-1,3$ и $-1,7$ Å. Следовательно, в растворе преимущественно реализуется ротамер g^-g^- . Аналогичная ситуация наблюдается и для других остатков D-Leu.

При сравнении значений функции F^r следует иметь в виду и то, что в каждой конформации ГА, приведенной на рис. 1, программа CONFORNMR автоматически выбрала оптимальный вариант стереохимического отнесения (при котором функция F^r минимальна). При этом в конформациях, различающихся величиной углов χ^1 и χ^2 остатка D-Leu, как правило, выбраны разные варианты стереохимического отнесения его β -протонов и групп $\text{C}^6 \text{H}_3$. Если же для разных конформаций выбрать одинаковое стереохимическое отнесение (а оно не должно меняться, например, при динамическом усреднении конформаций), то их штрафные функции будут различаться гораздо больше.

Итак, после сравнения значений штрафных функций и нарушений индивидуальных кросс-пиков ЯЭО в различных конформациях боковых цепей остатков лейцина значения их торсионных углов χ^1 определились однозначно. В то же время углы χ^1 остатка Val⁷ и χ^2 остатков D-Leu (кроме D-Leu¹⁴) не удается однозначно определить из-за внутримолекулярной подвижности ГА. Об этом свидетельствует наличие противоречивой системы кросс-пиков ЯЭО, которой нельзя полностью удовлетворить в одной конформации молекулы. Так, для остатка Val⁷, имеющего динамически усредненную КССВ протонов $\text{H} - \text{C}^{\alpha} \text{C}^{\beta} - \text{H}$ (7 Гц [1]), часть кросс-пиков ЯЭО лучше удовлетворяется для ротамера t , а другая часть — для ротамера g^+ (таблица). Более того, для многих кросс-пиков ЯЭО остатка Val⁷ ошибка Δr отрицательна в одной и положительна в другой конформации (таблица) и поэтому должна быть близка к нулю при усреднении двух конформаций. И в самом деле, зависимость штрафной функции F^r от статистического веса α одной из конформаций боковой цепи остатка Val⁷ имеет явно выраженный минимум, когда конформации t и g^+ равнонаселены (рис. 2). Интересно, что функция F^r для Val⁷ меньше в случае «медленного» обмена конформаций (см. рис. 2), когда время жизни ротамера превышает время корреляции вращения ГА в мицеллах SDS (2,5 нс).

Ошибки в межпротонных расстояниях Δr , вычисленные по объемам кросс-пиков ЯЭО, для низкоэнергетических конформаций ГА, различающихся значениями торсионных углов χ^1 Val⁷ и χ^2 D-Leu¹²*

Остаток	Кросс-пик ЯЭО**	Δr (Å)*** для ротамеров	
		t	g^+
Val ⁷	H ^α Val ¹ /H ^β Val ⁷	0,34	-1,02
	Q ^γ Val ¹ /H ^β Val ⁷	0,11	-1,16
	NH Val ⁷ /H ^β Val ⁷	0,12	-0,33
	H ^α Val ⁷ /H ^β Val ⁷	-0,19	0,23
	C ^{γ1} H ₃ Val ⁷ /C ^{4H} Trp ¹³	-1,32	-0,21
	H ^α Val ¹ /Q ^γ Val ⁷ 4*	-0,44	0,09
D-Leu ¹²		g^-g^-	g^-t
	H ^α Ala ⁵ /C ^{δ1} H ₃ D-Leu ¹² 4*	2,20	1,05
	NH Val ⁶ /C ^{δ1} H ₃ D-Leu ¹²	0,65	-0,42
	C ^{γ2} H ₃ Val ⁶ /H ^γ D-Leu ¹²	-1,91	-0,11
	C ^{γ1} H ₃ Val ⁶ /C ^{δ1} H ₃ D-Leu ¹² 4*	-0,03	-0,57
	C ^{γ2} H ₃ Val ⁶ /C ^{δ1} H ₃ D-Leu ¹² 4*	-0,23	-0,94
	H ^{β3} Trp ¹¹ /H ^γ D-Leu ¹²	0,45	-0,71
	C ^{4H} Trp ¹¹ /C ^{δ2} H ₃ D-Leu ¹² 4*	-0,76	0,00
	C ^{δ1} H ₃ D-Leu ¹² /NH Trp ¹³ 4*	-0,09	-0,51
	C ^{δ2} H ₃ D-Leu ¹² /C ^{6H} Trp ¹³ 4*	-0,08	0,27
C ^{δ1} H ₃ D-Leu ¹² /C ^{5H} Trp ¹³	0,00	-1,25	

* Значения энергии и штрафной функции E^r приведенных в таблице конформаций ГА указаны на рис. 3.

** Приведены только нарушающиеся ($|\Delta r| > 0,2$ Å) кросс-пики ЯЭО, образованные протонами рассматриваемой боковой цепи, для которых величина нарушения Δr в обеих рассматриваемых конформациях различается более чем на 0,2 Å. Обозначение Q^γ использовано для суммарных кросс-пиков ЯЭО, образованных обеими группами C^γH₃ остатков валина. В тех случаях, когда кросс-пик наблюдался в спектрах NOESY при обоих значениях τ_m (100 и 200 мс), для расчета Δr использована интенсивность, измеренная при τ_m 100 мс.

** Величины Δr для обоих ротамеров приведены при одном и том же варианте стереохимического отнесения всех астереоцентрических групп, поскольку анализируется возможность динамического усреднения двух ротамеров, при котором стереохимическое отнесение не должно меняться.

** Кросс-пики ЯЭО, наблюдавшиеся при τ_m 200 мс.

Для ротамеров g^-t и g^-g^- остатка D-Leu¹², а также tg^- и tt D-Leu⁴ и D-Leu¹⁰, различающихся величиной угла χ^2 , но близких энергетически и по величине штрафной функции F^r (рис. 4), наблюдается такая же ситуация, как и для Val⁷ (см. таблицу).

В конечном счете анализ конформаций ГА, проведенный на основе объемов кросс-пиков ЯЭО, указывает на корректность «базовой» структуры ионного канала, полученной ранее в рамках существенно более приближенной расчетной модели [2], и в то же время свидетельствует о подвижности боковых цепей остатков D-Leu и Val⁷. С учетом конформационной подвижности пространственную структуру ионного канала ГА в мицеллах SDS можно представить как суперпозицию энергетически уточненных конформаций димера, различающихся величиной торсионных углов χ^1 L-Val⁷ и χ^2 D-Leu⁴, D-Leu¹⁰ и D-Leu¹² (рис. 3). Все эти конформации достаточно близки, поскольку среднеквадратичное отклонение координат неводородных атомов для них составляет 0,3–0,8 Å. В то же время у них несколько

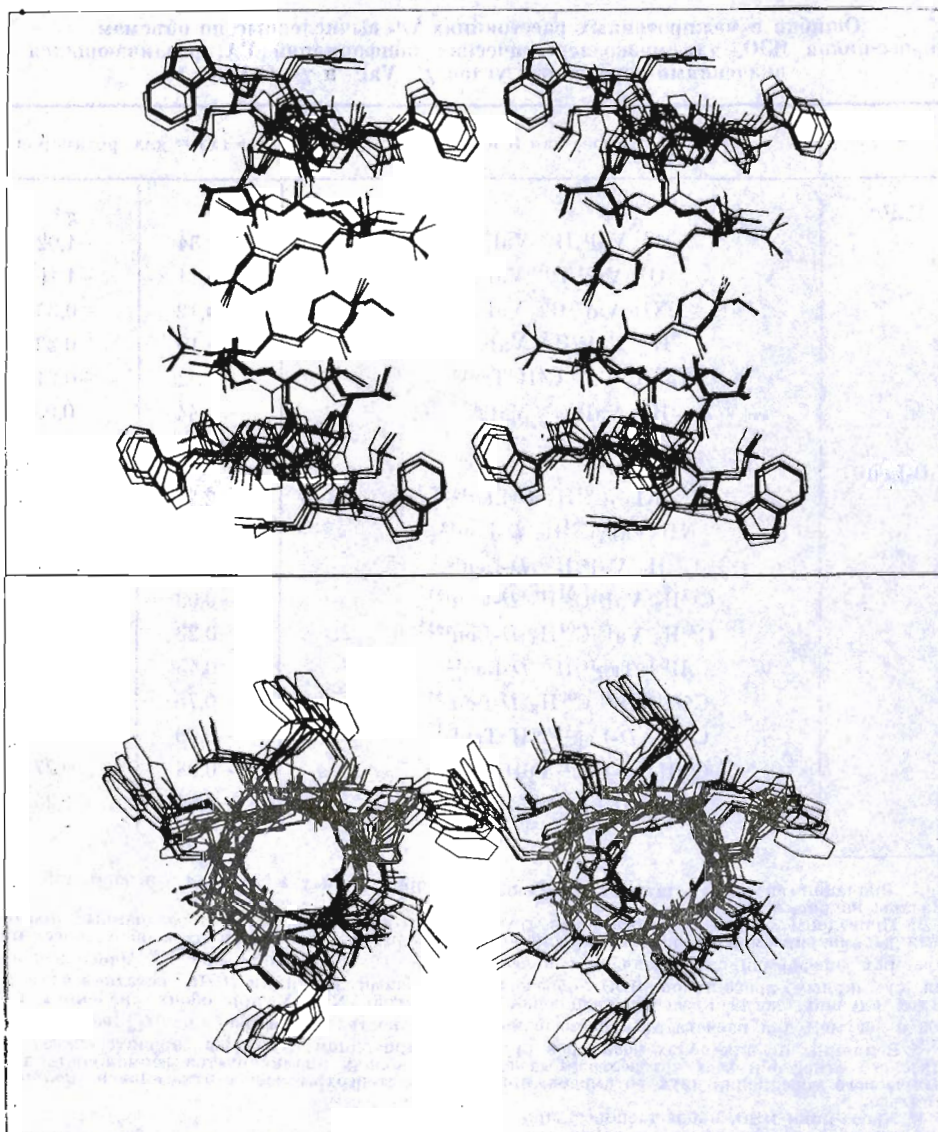


Рис. 3. Пространственная структура трансмембранного ионного канала грамицидина А ($\pi_{LD}^{6,3} \pi_{LD}^{6,3}$ -спираль) в двух проекциях. Совмещены низкоэнергетические конформации димера, различающиеся значениями торсионных углов χ^1 Val⁷ и χ^2 D-Leu^{4, 10, 12} (совмещение проводилось по всем неводородным атомам)

различаются ориентации пептидных групп (отклонения торсионных углов основной цепи ϕ и ψ достигают 25°), что может объяснить дисперсию проводимости ионного канала [2].

Интенсивности кросс-пиков ЯЭО в «базовой» конформации $\pi_{LD}^{6,3} \pi_{LD}^{6,3}$ -спирали ГА

Анализ конформаций боковых цепей ГА подтверждает корректность «базовой» конформации ионного канала, полученной в предыдущей работе. Поэтому рассмотрим соответствие именно этой структуры измеренным

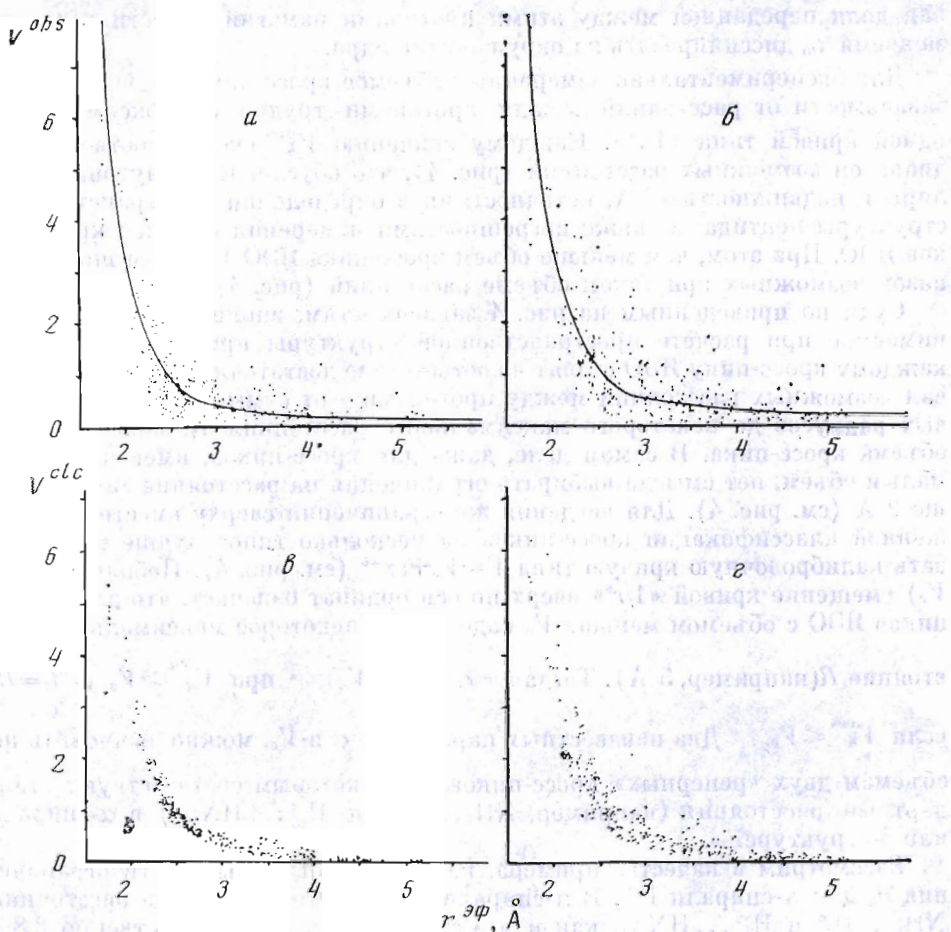


Рис. 4. Зависимость объемов кросс-пиков ЯЭО, рассчитанных (а, г) для «базовой» конформации ГА (V^{calc}) и измеренных (V^{obs}) (а, б) при τ_m 100 (а, в) и 200 мс (б, г) в спектрах NOESY ГА в мицеллах SDS- d_{25} в H_2O и 2H_2O от эффективных расстояний $r^{эф}$ между протонами

объемам кросс-пиков ЯЭО. Объемы кросс-пиков ЯЭО V_K^{calc} , рассчитанные для нее с учетом полной матрицы релаксации протонов, хорошо аппроксимируются зависимостью типа « $1/r^6$ » (рис. 4), что более отчетливо видно при использовании линейных координат (рис. 5). Разброс значений V_K^{calc} обусловлен тем, что объем кросс-пика ЯЭО зависит не только от расстояния между образующими его протонами, но и от расстояния до окружающих их протонов ГА, участвующих в процессе «спиновой диффузии». При увеличении времени обмена компонент намагниченности τ_m от 100 до 200 мс отклонения теоретических объемов кросс-пиков ЯЭО от зависимости « $1/r^6$ » возрастают (рис. 4), поскольку усиливается спиновая диффузия. Однако отклонения значительны лишь в тех случаях, когда спиновая диффузия происходит между тесно сближенными в пространстве геминальными протонами или метильными группами. Например, интенсивный расчетный кросс-пик между протоном $C^{\beta}H$ D -Val⁸ и метильной группой $C^{\alpha}H_3$ D -Leu¹⁴, удаленными на расстояние свыше 5 Å (один из «выбросов» на рис. 4), объясняется наличием между ними метильной группы $C^{\delta}H_3$ D -Leu¹⁴. Группа наиболее интенсивных кросс-пиков ЯЭО между геминальными протонами также «выпадает» из зависимости « $1/r^6$ » (рис. 5), так как существен-

ная доля переданной между этими протонами намагниченности успеваает за время τ_m диссипировать на окружающие ядра.

Для экспериментально измеренных объемов кросс-пиков ЯЭО (V_k^{obs}) их зависимости от расстояний между протонами трудно аппроксимировать одной кривой типа « $1/r^6$ ». Каждому значению V_k^{obs} скорее соответствует диапазон возможных расстояний (рис. 4), что обусловлено внутримолекулярной подвижностью ГА, неточностями в определении пространственной структуры пептида, а также погрешностями измерения объемов кросс-пиков ЯЭО. При этом, чем меньше объем кросс-пика ЯЭО V_k^{obs} , тем шире диапазон возможных при таком объеме расстояний (рис. 4).

Судя по приведенным на рис. 4 зависимостям, вполне оправдано принимаемое при расчете пространственной структуры приближение, когда каждому кросс-пику ЯЭО ставят в соответствие достаточно широкий интервал возможных расстояний между протонами — от суммы ван-дер-ваальсовых радиусов до некоторого максимального расстояния d_k , зависящего от объема кросс-пика. В самом деле, даже для кросс-пиков, имеющих очень малый объем, нет смысла выбирать ограничения на расстояние снизу больше 2 Å (см. рис. 4). Для введения же ограничений сверху вместо приближенной классификации кросс-пиков на несколько типов лучше использовать калибровочную кривую типа $V = V_0 + br^{-6}$ (см. рис. 4). Небольшое (на V_0) смещение кривой « $1/r^6$ » вверх по оси ординат означает, что для кросс-пиков ЯЭО с объемом меньше V_0 надо задать некоторое максимальное расстояние R (например, 5 Å). Тогда $d_k = \alpha (V_k^{obs} - V_0)^{-1/6}$ при $V_k^{obs} > V_0$ и $d_k = R$,

если $V_k^{obs} \leq V_0$. Два неизвестных параметра, α и V_0 , можно вычислить по объемам двух «реперных» кросс-пиков ЯЭО, которым соответствуют стандартные расстояния (например, $NH_i \dots H_i^\alpha$ и $H_i^\alpha \dots HN_{i+1}$) в α -спирали или β -структуре.

Рассмотрим в качестве примера, как можно было бы ввести ограничения d_k для π -спирали ГА. В π -спирали реализуются такие же расстояния $NH_i \dots H_i^\alpha$ и $H_i^\alpha \dots HN_{i+1}$, как и в β -структуре, т. е. соответственно 2,8–2,95 и 2,2–2,3 Å. Из-за перекрытия в спектрах NOESY для ГА наблюдаются лишь два кросс-пика ЯЭО NH_i/H_i^α и восемь кросс-пиков ЯЭО H_i^α/HN_{i+1} , которые можно однозначно отнести именно к этим парам протонов. В первом случае объемы колеблются от 0,02 до 0,56 при $\tau_m = 100$ мс и от 0,08 до 0,46 при $\tau_m = 200$ мс (объемы нормированы по среднему объему кросс-пика в спектре), а во втором — соответственно от 1,43 до 2,31 и от 1,41 до 2,11. Поскольку во втором случае измерено достаточно большое число объемов, можно считать, что максимальные из них соответствуют самым коротким расстояниям $H_i^\alpha \dots HN_{i+1}$, т. е. 2,2 Å. Поскольку калибровочная кривая $V^{obs} = V_0 + (d_k/\alpha)^{-6}$ должна ограничивать сверху всю область возможных значений объемов кросс-пиков ЯЭО, для расчета параметров α и V_0 нужно использовать максимальные значения объемов (например, 0,56 и 2,31 при $\tau_m = 100$ мс). Тогда (при соответствующих расстояниях 2,95 и 2,2 Å) параметр V_0 получается равным 0,2 при $\tau_m = 100$ мс и 0,12 при $\tau_m = 200$ мс, т. е. несколько больше, чем постоянный уровень шума в спектрах NOESY (ΔV_i в уравнении (4)), принятый при расчете (0,1). Соответствующие кривые приведены на рис. 5. Видно, что полученные по ним ограничения d_k для ряда кросс-пиков ЯЭО, образованных в основном протонами боковых цепей, занижены, поскольку соответствующие точки лежат выше кривых. Тем не менее эти ограничения можно использовать при приближенном расчете пространственной структуры.

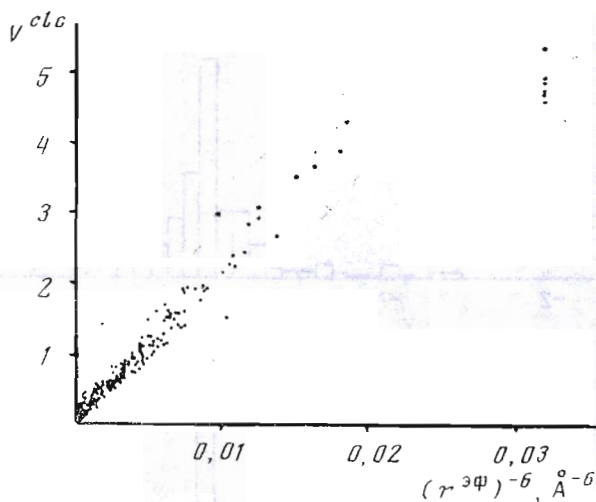


Рис. 5. Зависимость объемов кросс-пиков ЯЭО, рассчитанных для полной матрицы релаксации протонов в «базовой» конформации ГА (V^{clc}) при τ_m 100 мс от обратной величины шестой степени эффективного расстояния $r^{эф}$ между протонами

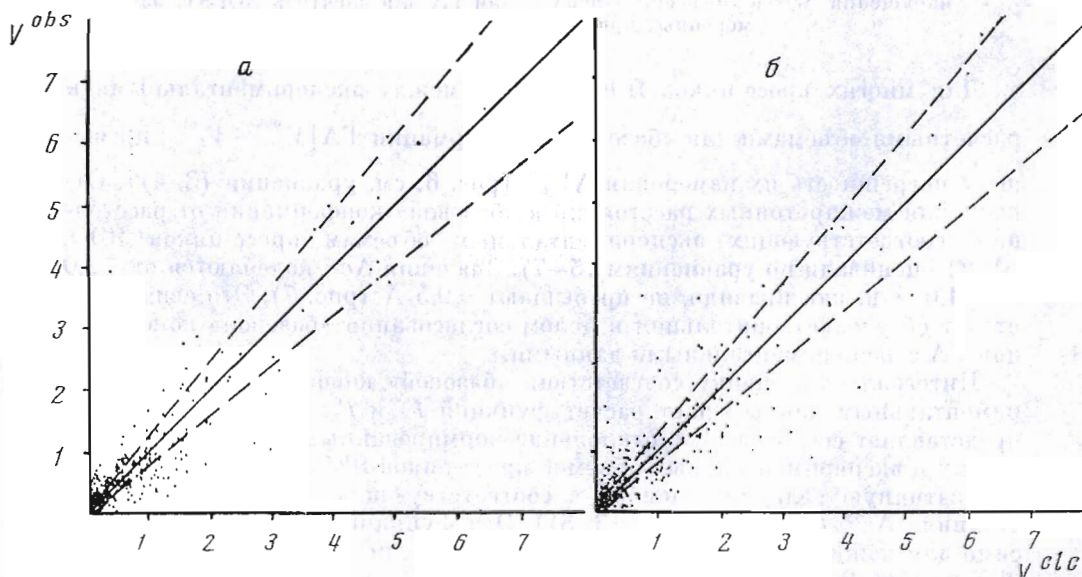


Рис. 6. Корреляция объемов кросс-пиков ЯЭО, рассчитанных для «базовой» конформации ГА (V^{clc}) и измеренных в спектрах NOESY ГА в H_2O и 2H_2O при τ_m 100 (а) и 200 мс (б). Штриховыми линиями ограничена область значений объемов, в пределах которой их отклонение $|V_k^{obs} - V_k^{clc}|$ не превышает погрешности измерения ΔV_k (см. уравнение (10)). Значения $V^{obs}=1$ и $V^{clc}=1$ соответствуют среднему объему кросс-пиков в экспериментальном и теоретическом спектрах NOESY

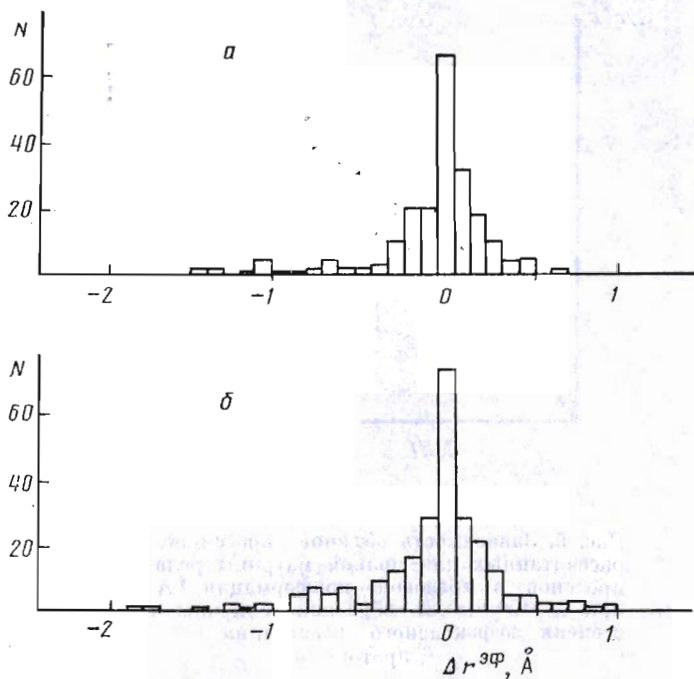
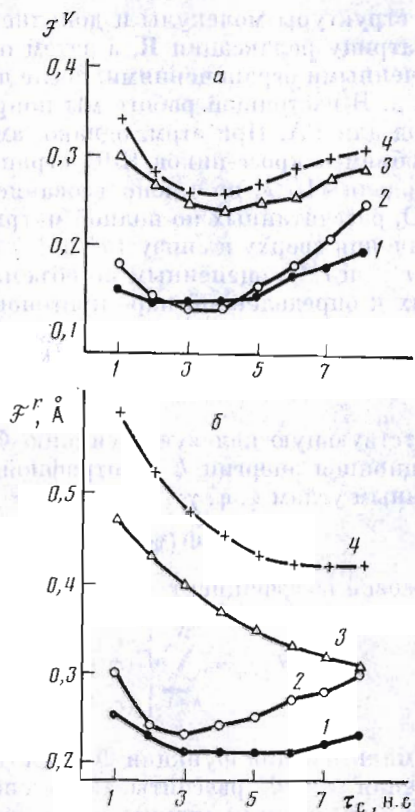


Рис. 7. Гистограмма числа нарушающихся контактов ЯЭО от величины нарушения Δr^{ϕ} в «базовой» конформации ГА для спектров NOESY, измеренных при τ_m 100 (а) и 200 мс (б)

Для многих кросс-пиков ЯЭО разница между экспериментальными и расчетными объемами для «базовой» конформации ГА $|V_k^{\text{obs}} - V_k^{\text{calc}}|$ превышает погрешность их измерения ΔV_k^{obs} (рис. 6; см. уравнения (3, 4)). Отклонения межпротонных расстояний в «базовой» конформации от расстояний, соответствующих экспериментальным объемам кросс-пиков ЯЭО, (Δr^{ϕ}) оценивали по уравнениям (5–7). Значения Δr^{ϕ} колеблются от $-2,0$ до $+1,0$ Å и, как правило, не превышают $\pm 0,5$ Å (рис. 7). Это свидетельствует об удовлетворительном в целом согласовании «базовой» конформации ГА с экспериментальными данными.

Интегральную оценку соответствия «базовой» конформации ГА экспериментальным данным дает расчет функций F^v и F^r , первая из которых представляет собой среднее отклонение нормированных значений теоретических и экспериментальных объемов кросс-пиков ЯЭО, а вторая — среднеквадратичную величину ошибок в соответствующих межпротонных расстояниях Δr^{ϕ} (см. уравнения (3, 8)). Эти функции вычислялись независимо для каждого из четырех спектров NOESY, полученных при τ_m 100 и 200 мс для ГА, встроенного в мицеллы SDS- d_{25} в растворе H_2O и $^2\text{H}_2\text{O}$. Функции F^v и F^r зависят от времени корреляции τ_c , использованного для вычисления теоретических объемов кросс-пиков ЯЭО (рис. 8). Функции минимальны при τ_c 3–4 нс, близком к экспериментально измеренному значению $2,5 \pm 0,5$ нс. В H_2O (кривые 1 и 2 на рис. 8) измеряли объемы кросс-пиков ЯЭО между протонами основной цепи NH и всеми остальными протонами, а в $^2\text{H}_2\text{O}$ (кривые 3 и 4) — между алифатическими и ароматическими протонами боковых цепей аминокислотных остатков. В первом случае функции ($F^v \approx 0,14$ и $F^r \approx 0,2$ Å при $\tau_c = 3$ нс) существенно меньше, чем во втором ($F^v \approx 0,25$ и $F^r \approx 0,4-0,5$ Å). Это можно объяснить подвижностью боковых цепей или большей погрешностью измерения объемов

Рис. 8. Зависимости штрафных функций F^v (а) и F^r (б) от времени корреляции τ_c для «базовой» конформации ГА. Зависимости построены для интенсивностей кросс-пиков ЯЭО, измеренных в спектрах NOESY ГА, встроенного в мицеллы SDS- d_{25} в H_2O (1, 2) и 2H_2O (3, 4) при τ_m 100 (1, 3) и 200 мс (2, 4)



кросс-пиков ЯЭО в алифатической области спектров NOESY. Функции F^v и F^r по-разному ведут себя в зависимости от τ_c , поскольку вторая из них более чувствительна к ошибкам в объемах низкоинтенсивных кросс-пиков. Если конформация не очень хорошо согласуется с объемами кросс-пиков, т. е. функция F^r велика, то она не имеет минимума и просто убывает с увеличением τ_c из-за того, что выравниваются объемы всех кросс-пиков ЯЭО (кривые 3, 4 на рис. 8б). При увеличении τ_m штрафные функции F^v и F^r несколько возрастают (рис. 8), что, по-видимому, связано с появлением в спектрах NOESY дополнительных низкоинтенсивных сигналов.

Оптимизация структуры ГА

Использованная нами методика уточнения пространственной структуры на основе объемов кросс-пиков ЯЭО (схема) нетрадиционна. Обычно пространственную структуру белков, реконструированную по данным ЯМР, уточняют путем минимизации суммы конформационной энергии и штрафной функции, задающей экспериментальные ограничения на межатомные расстояния и торсионные углы [10, 11]. При этом ограничения на расстояния d_k между протонами задают приближенно и достаточно произвольным образом, используя классификации кросс-пиков ЯЭО на несколько типов в соответствии с их интенсивностями. Более корректная процедура основана на количественном согласовании расчетных и экспериментальных значений либо самих объемов кросс-пиков ЯЭО [12], либо соответствующих им элементов матрицы релаксации R [13, 14]. Во втором случае процедура расчета (IRMA) заключается в том, что сначала получают ограничения на попарные расстояния между протонами путем «обратной трансформации» матрицы теоретических объемов кросс-пиков ЯЭО, рассчитанной для

стартовой структуры молекулы и дополненной экспериментальными объемами, в матрицу релаксации \mathbf{R} , а затем оптимизируют структуру молекулы с полученными ограничениями, после чего расчет матрицы \mathbf{R} повторяют снова и т. д. В настоящей работе мы попробовали использовать аналогичный подход для ГА. При этом, однако, вместо «обратной трансформации» матрицы объемов кросс-пиков ЯЭО ограничения на расстояния d_k оценивали по модели « $1/r^6$ », но с использованием теоретических объемов кросс-пиков ЯЭО, рассчитанных по полной матрице релаксации. Предполагалось, что ограничения сверху и снизу (d^+ и d^-) соответствуют эффективным расстояниям $r^{\text{эф}+}$ и $r^{\text{эф}-}$, оцененным по объемам кросс-пиков ЯЭО, однозначно отнесенных к определенной паре протонов, по уравнениям (6)

$$\begin{aligned} d_k^- &= r_k^{\text{эф}-}, \\ d_k^+ &= r_k^{\text{эф}+}. \end{aligned} \quad (9)$$

Соответствующую целевую функцию Φ , представляющую собой сумму конформационной энергии E и штрафной функции F_{pen} , минимизировали по торсионным углам ψ , φ , χ :

$$\Phi(\psi, \varphi, \chi) = E + \Omega F_{\text{pen}}, \quad (10)$$

где Ω — весовой коэффициент, а

$$F_{\text{pen}} = \sum_{k=1}^N \begin{cases} 0, & d_k^+ \geq r_k \geq d_k^-, \\ (r_k - d_k^+)^2, & r_k > d_k^+, \\ (r_k - d_k^-)^2, & r_k < d_k^-. \end{cases} \quad (11)$$

После минимизации функции Φ теоретические объемы кросс-пиков ЯЭО и ограничения d^+ и d^- рассчитываются снова, и минимизация повторяется. Процедура оптимизации структуры прекращается, когда изменение ограничений d^+ и d^- на двух смежных итерациях не превышает некоторого критерия δ . При $\delta = 0,2 \text{ \AA}$ для ГА оказалось достаточно одной итерации.

При одновременном учете всех 224 кросс-пиков ЯЭО ГА, однозначно отнесенных к определенной паре протонов (и $\Omega = 100 \text{ ккал}/(\text{моль} \cdot \text{\AA}^2)$), результаты минимизации неудовлетворительны, поскольку происходит лишь небольшое (на $0,1 \text{ \AA}$) уменьшение функции F^r , сопровождающееся значительным (свыше $80 \text{ ккал}/\text{моль}$) увеличением энергии. Для сравнения отметим, что аналогичная «подгонка» расчетных и экспериментальных значений КССВ протонов $\text{H} - \text{NC}^\alpha - \text{H}$ для той же «базовой» конформации ГА позволила добиться их полного согласования в пределах погрешности измерения и сопровождалась увеличением конформационной энергии всего на $3,7 \text{ ккал}/\text{моль}$ [2]. По-видимому, объемы наблюдаемого набора кросс-пиков ЯЭО противоречивы из-за влияния внутримолекулярной подвижности, и в частности одновременной реализации нескольких ротамеров боковых цепей ГА.

Часть нарушающихся кросс-пиков ЯЭО, однако, образована только протонами основной цепи ГА (включая β -протоны). В частности, в «базовой» конформации ГА наблюдается несколько кросс-пиков ЯЭО между протонами остатков Ala^3 и Trp^9 , а также Ala^5 и Trp^{14} , для которых $\Delta r^{\text{эф}} < -0,5 \text{ \AA}$. Это указывает на то, что два соседних витка π -спирали слишком удалены друг от друга. Минимизация штрафных функций с учетом только 26-кросс-пиков ЯЭО между протонами основной цепи и только ограничений сверху ($\Omega = 10 \text{ ккал}/(\text{моль} \cdot \text{\AA}^2)$) позволяет устранить нарушения в расстояниях между протонами соседних витков π -спирали, однако при этом функция для всего набора кросс-пиков ЯЭО по-прежнему убывает незначительно (всего на $0,04 \text{ \AA}$), а энергия возрастает на $15 \text{ ккал}/\text{моль}$. Такой результат также нельзя признать вполне удовлетворительным. По-видимому, неэф-

эффективность оптимизации пространственной структуры в данном случае объясняется тем, что пространственная структура ГА уже определена с достаточной точностью, а сохраняющиеся различия между экспериментальными и теоретическими объемами кросс-пиков ЯЭО обусловлены внутримолекулярной подвижностью ГА и в принципе не могут быть устранены при рассмотрении только одной «статической» конформации пептида.

Заключение

Реконструированная нами ранее по данным ЯМР конформация ионного канала ГА [2] удовлетворительно согласуется с объемами кросс-пиков ЯЭО, измеренными в спектрах NOESY димера ГА, встроенного в мицеллы SDS. Эта конформация представляет собой незначительно искаженную правую $\overrightarrow{\pi}_{LD}^{6,3} \overleftarrow{\pi}_{LD}^{6,3}$ -спираль, в которой карбонильные группы остатков *D*-Leu^{10,12,14}, находящиеся на концах димера, ориентированы таким образом, что образуют «воронку», обеспечивающую частичную дегидратацию катионов. Отличительной особенностью структуры ГА является также ориентация индольных колец остатков триптофана, обеспечивающая оптимальное электростатическое взаимодействие их дипольных моментов с отрицательно заряженными головками детергента.

Для боковых цепей остатков Val⁷ и *D*-Leu^{4,10,12} ГА в мицеллах SDS одновременно реализуется по две низкоэнергетические конформации, различающиеся величиной торсионных углов соответственно χ^1 и χ^2 . Переход от одной конформации к другой сопровождается изменением ориентации пептидных групп, образующих ионный канал, что объясняет дисперсию ионной проводимости канала.

Отклонения расчетных и экспериментальных объемов, наблюдаемые для некоторых кросс-пиков ЯЭО, по-видимому, обусловлены внутримолекулярной подвижностью ГА, а также погрешностью измерения объемов кросс-пиков в спектрах NOESY. Лишь незначительная часть этих отклонений устраняется в рамках простейшей модели динамического усреднения конформаций, соответствующих локальным минимумам энергии. Попытка полностью устранить нарушения путем минимизации отклонений расчетных и экспериментальных объемов кросс-пиков ЯЭО оказалась малоэффективной. Вероятно, более адекватную картину можно получить путем моделирования молекулярной динамики ГА и усреднения спектральных параметров во времени.

Экспериментальная часть

Грамицидин А встраивали в мицеллы SDS-*d*₂₅ (5 мМ ГА, 250 мМ SDS-*d*₂₅ в смеси вода (²H₂O или H₂O), трифторэтанол-*d*₃ (мольное отношение 16:1), pH 7,0, 60°C) как в работе [15]. Двумерные спектры ¹H-ЯМР (500 МГц) ЯЭО (NOESY) получали на спектрометре WM-500 Bruker (ФРГ), как в [15]. В каждом эксперименте после окончания времени регистрации сигнала (*t*₂) перед началом следующей серии импульсов следовал временной интервал D1=2 с для достижения равновесного состояния ядерной намагниченности. Для уменьшения динамического диапазона спектров сигнал растворителя (²H₂O или H₂O) насыщали селективным радиочастотным импульсом в течение всего времени эксперимента, за исключением времени регистрации сигнала *t*₂. Преобразование Фурье для получения фазоизбирательных двумерных спектров поглощения выполнено при помощи программы DISR88 Bruker. Перед этим матрицы данных во временной области 512×2048 точек (NOESY) дополняли нулями до 2048×4096 точек для улучшения цифрового разрешения. Далее по методике, описанной в работе [16], проводилась коррекция базовой плоскости.

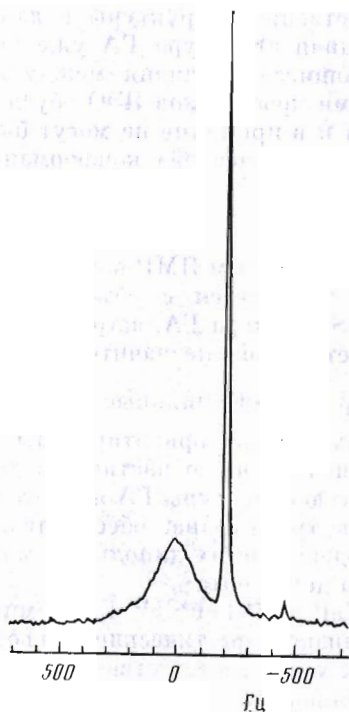


Рис. 9. Спектр ^2H -ЯМР (76,7 МГц) $[[^2\text{H}_5]\text{Trp}^{9,11,13,15}]$ грамицидина А (5 мМ) в мицеллах SDS (мольное отношение пептид – детергент 1 : : 50) в смеси $\text{H}_2\text{O} - \text{F}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (мольное отношение 16 : 1), pH 7,0, 60°C

Объемы кросс-пиков ЯЭО измеряли интегрированием в заданном прямоугольнике при помощи стандартной процедуры программы DISR88. Измерения проводились независимо для четырех спектров NOESY (при $\tau_m = 100$ и 200 мс), полученных для образцов, растворенных в H_2O и $^2\text{H}_2\text{O}$. Для спектров NOESY, полученных для мицелл, содержащих ГА в растворе H_2O , объемы измеряли над диагональю в области, ограниченной химическими сдвигами протонов NH вдоль оси ω_2 и всех протонов вдоль оси ω_1 , для спектров NOESY ГА в растворах $^2\text{H}_2\text{O}$ – в области кросс-пиков от алифатических и ароматических протонов над диагональю $\omega_1 = \omega_2$. В четырех спектрах NOESY были измерены объемы 541 кросс-пика ЯЭО.

Индольные группы остатков триптофана трансмембранного ионного канала грамицидина А, встроенного в мицеллы SDS, находятся в единственной фиксированной относительно остальной части молекулы конформации [2]. Поэтому время τ_c , рассчитанное из ширины линии в спектре ^2H -ЯМР ГА, у которого дейтерированы индольные группы, должно быть близко к времени вращательной корреляции молекулы. Индольные группы остатков триптофана ГА дейтерированы как в работе [17]. Спектр ^2H -ЯМР 92 МГц $[[^2\text{H}_5]\text{Trp}^{9,11,13,15}]$ грамицидина А в мицеллах SDS показан на рис. 9. Узкий интенсивный сигнал принадлежит воде (естественное содержание изотопа $^2\text{H} - 1,5 \cdot 10^{-2}\%$), широкий сигнал – грамицидину А. Расчет τ_c проводился по формуле [18]

$$w_{1/2} = \frac{3\pi}{10} Q_D^2 \left[1,5\tau_c \frac{2,5\tau_c}{1 + (\omega\tau_c)^2} + \frac{\tau_c}{1 + 4(\omega\tau_c)^2} \right], \quad (12)$$

где $w_{1/2}$ – ширина линии в герцах на полувысоте, Q_D – квадрупольная константа, равная 183 кГц [17], ω – рабочая частота спектрометра в радианах. В нашем случае $w_{1/2} = 240 \pm 10$ Гц и, следовательно, $\tau_c = 2,5 \pm 0,2$ нс.

Времена неселективной спин-решеточной релаксации T_1 протонов ГА измеряли с помощью метода «инверсия-восстановление» (IR) [19]. Задержка для восстановления равновесной намагниченности равнялась 5 с.

Поскольку ошибка во временах T_1 незначительно сказывается на расчетных объемах кросс-пиков ЯЭО [4], то для всех протонов, кроме ароматических, использовали характерные средние времена T_1 : 1,0 с — для протонов NH, 0,8 с — для протонов $C^{\alpha}H$, 0,4 с — для алифатических γ - и δ -протонов. Времена T_1 ароматических протонов находились в интервале 0,9–2,2 с и использовались для каждого протона индивидуально.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arseniev A. S., Barsukov I. L., Bystrov V. F., Lomize A. L., Ovchinnikov Yu. A. // FEBS Lett. 1985. V. 186. № 2. P. 168–174.
2. Арсеньев А. С., Ломизе А. Л., Барсуков И. Л., Быстров В. Ф. // Биол. мембраны. 1986. Т. 3. № 11. С. 1077–1104.
3. Broido S. M., James T. L., Zon G., Keepers J. W. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 150. № 2. P. 117–128.
4. Соболев А. Г., Арсеньев А. С. // Биоорганич. химия. 1988. Т. 14. № 8. С. 997–1013.
5. Ломизе А. Л., Соболев А. Г., Арсеньев А. С. // Биоорганич. химия. 1990. Т. 16. № 2. С. 179–201.
6. Tropp J. J. // J. Chem. Phys. 1980. V. 72. № 11. P. 6035–6043.
7. Kessler H., Griesinger C., Lautz J., Muller A., Gunsteren W., Berendsen H. J. C. // J. Amer. Chem. Soc. 1988. V. 110. № 11. P. 3393–3396.
8. Motanu F. A., McGuire R., Burgess A. W., Scheraga H. A. // J. Phys. Chem. 1975. V. 79. № 23. P. 2361–2381.
9. Nemethy G., Pottle M. S., Scheraga H. A. // J. Phys. Chem. 1983. V. 87. № 11. P. 1883–1887.
10. Billeter M., Schaumann T., Braun W., Wuthrich K. // Biopolymers. 1990. V. 29. № 4/5. P. 695–706.
11. Billeter M., Qian Y., Otting G., Muller M., Gehering W. J., Wuthrich K. // J. Mol. Biol. 1990. V. 214. № 3. P. 183–197.
12. Yip P., Case D. A. // J. Magn. Reson. 1989. V. 83. P. 643–648.
13. Boelens R., Koning T. M. G., Marel G. A., Boom J. H., Kaptein R. // J. Magn. Res. 1989. V. 82. № 2. P. 290–308.
14. Borgias B. A., James T. L. // J. Magn. Res. 1988. V. 79. № 3. P. 493–512.
15. Арсеньев А. С., Барсуков И. Л., Быстров В. Ф., Овчинников Ю. А. // Биол. мембраны. 1986. Т. 3. № 5. С. 437–462.
16. Barsukov I. L., Arseniev A. S. // J. Magn. Res. 1987. V. 73. № 1. P. 148–149.
17. Macdonald P. M., Seelig J. // Biochemistry. 1988. V. 27. № 7. P. 2357–2364.
18. Abragam A. The Principles of Nuclear Magnetism. Oxford University Press, 1961.
19. Vold R. L., Waugh J. S., Klein M. P., Phelps D. E. // J. Chem. Phys. 1968. V. 48. № 8. P. 3831–3832.

Поступила в редакцию
4.VII.1991

A. L. LOMIZE, V. Yu. OREKHOV, A. S. ARSENIYEV

REFINEMENT OF THE SPATIAL STRUCTURE OF THE GRAMICIDIN A TRANSMEMBRANE ION-CHANNEL

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
Moscow

The spatial structure of the gramicidin A (GA) transmembrane ion-channel was refined on the base of cross-peak volumes measured in NOESY spectra (mixing time $\tau_m=100$ and 200 ms). The refinement methods included the comparison of experimental cross-peak volumes with those calculated for low-energy GA conformations, dynamic averaging of the low-energy conformation set and restrained energy minimization. Accuracy of the spatial structure determination was estimated by the penalty function F_r , defined as a root mean square deviation of interproton distances corresponding to the calculated and experimental cross-peak volumes.

As the initial conformation we used the right-handed $\pi_{LD}^{6,3} \pi_{LD}^{6,3}$ helix established on the base of NMR data regardless of the cross-peak volumes. The conformation is in a good agreement with NOE cross-peak volumes (F_r 0,2 to 0,5 Å depending on NOESY spectrum). For a number of NOEs formed by the side chain protons, distances errors

were found as much as 0,5–2,0 Å. Restrained energy minimization procedure had little further success. However some of these errors were eliminated by the change in torsional angle χ^2 of *D*-Leu¹² and dynamic averaging of the Val⁷ side chain conformations. Apparently, majority of deviations of the calculated and experimental cross-peak volumes are due to the intramolecular mobility of GA and cannot be eliminated within the framework of rigid globule model.

In summary the spatial structure of GA ion-channel can be thought as a set of low-energy conformations, differing by the side chain torsion angles χ^1 Val⁷ and χ^2 *D*-Leu⁴ and *D*-Leu¹⁰ and the orientation of the C-terminal ethanolamine group. Root mean square differences between the atomic coordinates of conformations are in the range of 0,3–0,8 Å.

REFINEMENT OF THE SPATIAL STRUCTURE OF THE GLOBULE
TRANSMEMBRANE FOR GA/VAL