



УДК 543.422.25:577.322.523

## ОСТАТОЧНЫЕ КОНСТАНТЫ ДИПОЛЬ-ДИПОЛЬНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКИЕ РАСЧЕТЫ КАК ОСНОВА ДЛЯ УТОЧНЕНИЯ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ

© 2006 г. Е. В. Тищенко\*, А. Г. Соболев\*, С. А. Крачковский\*,\*\*#, Л. И. Васильева\*,  
С. Б. Нольде\*, А. А. Шульга\*, М. П. Кирпичников\*, А. С. Арсеньев\*

\*Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

\*\*Московский физико-технический институт, Долгопрудный Московская обл.

Поступила в редакцию 02.03.2006 г. Принята к печати 29.03.2006 г.

Обсуждаются точность методики и факторы, влияющие на интерпретацию остаточных констант диполь-дипольного взаимодействия (ОКДДВ) при анализе пространственной структуры частично ориентированного белка. Для белка барстар, частично ориентированного в жидкокристаллической матрице, состоящей из бицелл димиристоилфосфатидилхолин/дигексаноилфосфатидилхолин, измерены ОКДДВ (эксп-ОКДДВ) для пар ядер  $^1\text{H}$ – $^{15}\text{N}$ . Наблюдаемые константы находятся в хорошем соответствии с пространственными структурами барстара, полученными ранее методами рентгеноструктурного анализа и ЯМР. Однако расхождения между эксп-ОКДДВ и ОКДДВ, рассчитанными на основе известных структур барстара (расч-ОКДДВ), в 3–4 раза превышают экспериментальную погрешность. Эти расхождения могут быть объяснены различиями структур в кристалле и в растворе, ограниченной точностью метода рентгеноструктурного анализа и внутримолекулярной подвижностью белка. На основании сравнения результатов моделирования молекулярной динамики барстара в растворе, кристаллографических структур и экспериментальных ОКДДВ показано, что методы молекулярной динамики обеспечивают хорошее описание характера и амплитуды внутренних движений и их следует использовать для корректного учета ОКДДВ при установлении пространственной структуры белков в растворе по данным спектроскопии ЯМР.

*Ключевые слова:* белки, пространственная структура, ЯМР, остаточные константы диполь-дипольного взаимодействия.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время при изучении структур биологических макромолекул методом ЯМР основным источником структурной информации являются ограничения на попарные расстояния между протонами, получаемые при анализе данных о ядерном эффекте Оверхаузера [1]. Кроме того, используются константы скалярного спин-спинового взаимодействия (КССВ), дающие ограничения на двугранные углы [2], и информация о внутримолекулярных водородных связях, получаемая из экспериментов по обмену протонов NH на дейте-

рий растворителя или из спин-спиновых взаимодействий, передаваемых через водородные связи [3]. Большинство из перечисленных выше ограничений являются локальными по своей физической природе. Используя эти ограничения, удается с хорошей точностью установить локальную структуру макромолекулы и получить набор пространственных структур, хорошо согласующихся с экспериментальными данными. Тем не менее, часто остаются неопределенности в строении отдельных участков молекулы и/или взаимной ориентации элементов вторичной структуры, обусловленные недостаточным количеством ограничений “дальнего порядка”, т.е. ограничений на взаимное положение атомов остатков, находящихся далеко друг от друга в первичной структуре и/или в пространстве. Одна из возможностей пополнить набор ограничений, особенно ограничений “дальнего порядка” – добавление к имеющимся данным информации о межъядерных диполь-дипольных взаимодействиях, проявляющихся при частичном ориентировании исследуемых молекул [4–7]. В

Сокращения: КССВ – константа спин-спинового взаимодействия; ОКДДВ – остаточная константа диполь-дипольного взаимодействия; РСА – рентгеноструктурный анализ; ЯЭО – ядерный эффект Оверхаузера; ДНРС – дигексаноилфосфатидилхолин; ДМРС – димиристоилфосфатидилхолин; HSQC – гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия; PDB – Protein Data Bank; RMSD – среднеквадратичное отклонение.

# Автор для связи (тел.: (495) 330-74-83; факс: (495) 335-50-33; эл. почта: serega@nmr.ru).

настоящей работе на примере молекулы белка барстар проанализированы возможности и ограничения использования величин остаточных диполь-дипольных взаимодействий в частично ориентированных молекулах для повышения точности определения пространственной структуры белков в растворе.

### КРАТКАЯ ТЕОРИЯ

Если движение молекулы изотропно и быстро в шкале времен ЯМР, то наблюдать прямые диполь-дипольные взаимодействия невозможно. Если же оно анизотропно, то межъядерные диполь-дипольные взаимодействия удобно регистрировать по изменениям в наблюдаемой КССВ взаимодействующих ядер при частичной ориентации макромолекулы. В данной работе мы ограничимся рассмотрением прямых диполь-дипольных взаимодействий ядер амидных групп  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ , которые проявляются в спектрах ориентированных белков как изменения наблюдаемых КССВ,  $\delta J$  ядер  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ :

$$\delta J = J^{or} - J, \quad (1)$$

где  $J^{or}$  и  $J$  – наблюдаемые КССВ пары ядер для ориентированного и неориентированного ансамбля молекул. Для ядер  $k$  и  $l$  молекулы, вращение которой в упорядоченной внешней среде вокруг различных осей затруднено в неодинаковой степени (анизотропия вращательной диффузии) согласно [8]:

$$\delta J_{kl} = h \frac{\gamma_k \gamma_l}{r_{kl}^3} \times \left[ A_a (1 - 3 \cos^2 \theta_{kl}) - \frac{3}{2} A_r \sin^2 \theta_{kl} \cos 2\phi_{kl} \right], \quad (2)$$

где  $A_a$  и  $A_r$  – соответственно аксиальная и ромбическая компоненты тензора ориентации,  $\phi_{kl}$  и  $\theta_{kl}$  – азимутальный и полярный углы межъядерного вектора  $\vec{r}_{kl}$  в системе координат тензора ориентации,  $\gamma_k$  и  $\gamma_l$  – гиромагнитные отношения ядер  $k$  и  $l$ ,  $h$  – постоянная Планка. Формулу (2) удобно преобразовать к следующему виду:

$$\delta J_{kl} = D_a (1 - 3 \cos^2 \theta_{kl}) - \frac{3}{2} D_r \sin^2 \theta_{kl} \cos 2\phi_{kl}, \quad (3)$$

$$D_a = h \frac{\gamma_k \gamma_l}{r_{kl}^3} A_a, \quad D_r = h \frac{\gamma_k \gamma_l}{r_{kl}^3} A_r.$$

Формулы (2), (3) получены в предположении, что исследуемая молекула жесткая. В действительности, межъядерный вектор  $\vec{r}_{kl}$  в молекулярной системе координат колеблется вокруг некоторого среднего значения. Кроме того, межъядерное

расстояние  $r_{kl}$  тоже меняется в определенных пределах. Степень подвижности таких векторов обычно описывают параметром порядка  $S$  [9]:

$$S^2 = \frac{4\pi}{5} \left\langle \frac{1}{r_{kl}^3} \right\rangle^{-1} \sum_{m=-2}^2 \left\langle \frac{Y_2^m(\theta_{kl}, \phi_{kl})}{r_{kl}^3} \right\rangle \left\langle \frac{Y_2^{m*}(\theta_{kl}, \phi_{kl})}{r_{kl}^3} \right\rangle, \quad (4)$$

где  $Y_2^m(\theta_{kl}, \phi_{kl})$  – сферическая функция 2-го ранга,  $\phi_{kl}$  и  $\theta_{kl}$  – азимутальный и полярный углы межъядерного вектора  $\vec{r}_{kl}$  в лабораторной системе координат, угловые скобки означают усреднение по ансамблю молекул. Параметры порядка обычно получают из релаксационных измерений, используя так называемый “модель-независимый подход” [10–12]. Как правило, для векторов  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  амидных групп основной цепи белка значения  $S^2$  лежат в районе 0.8–0.9, что примерно соответствует колебаниям в конусе с углом раствора 10–30°. В работах [9, 13, 14] предлагается учитывать внутренние движения белка введением простой поправки к формулам (2), (3):

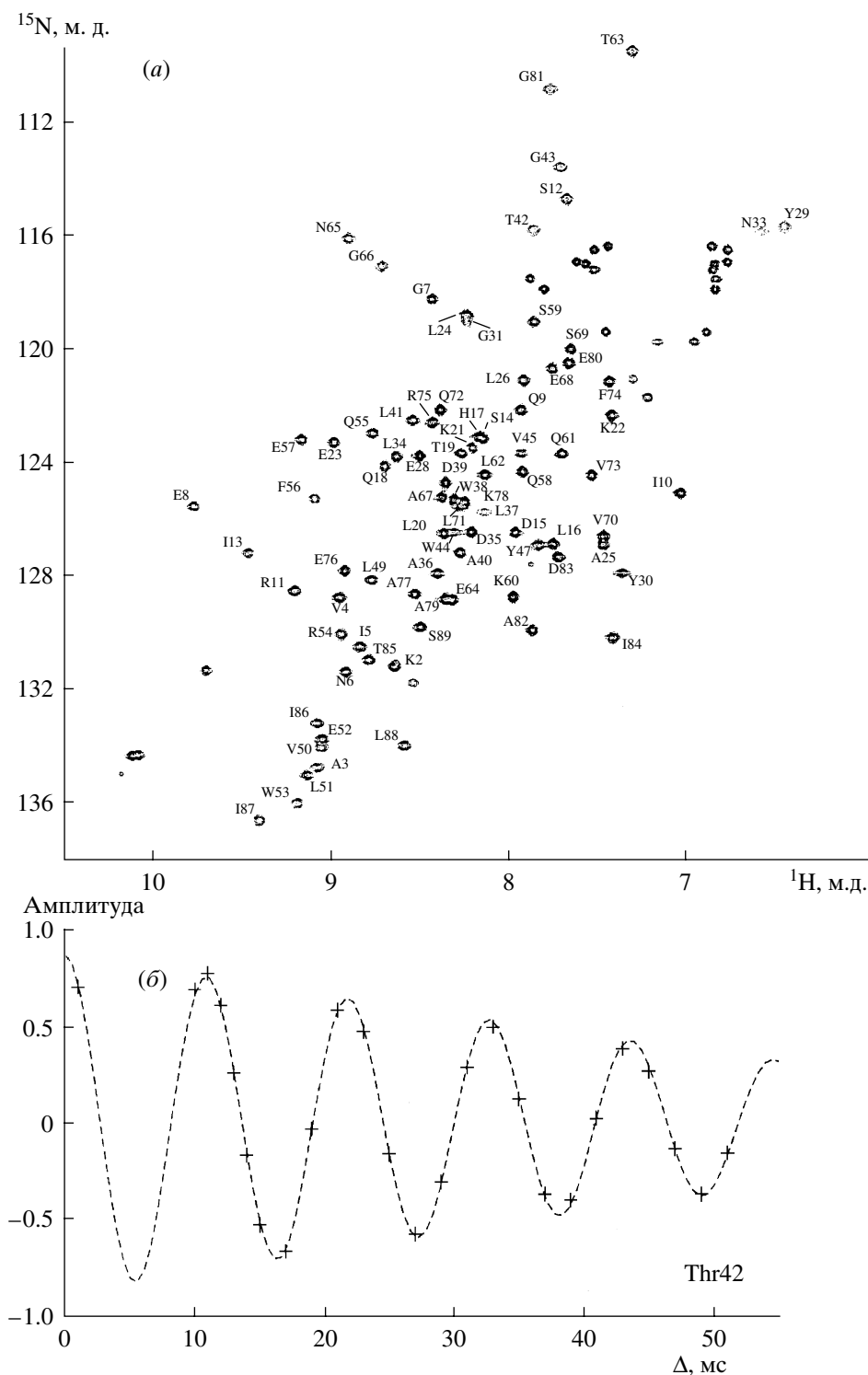
$$\delta J^{obs} = \langle \delta J \rangle = S \delta J(\langle \theta, \phi \rangle), \quad (5)$$

т.е. представляют наблюдаемую КДДВ,  $\delta J^{obs}$  как шкалированную на параметр порядка  $S$  константу от среднего вектора,  $\delta J(\langle \theta, \phi \rangle)$ . Корректность такого подхода будет обсуждена ниже.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Частичной ориентации молекулы можно добиться, используя анизотропию ее магнитной восприимчивости (ориентирование во внешнем магнитном поле [13, 15–17]) или наличие у нее электрического дипольного момента (ориентирование во внешнем электрическом поле [18]). Однако анизотропия магнитной восприимчивости большинства белков мала и не позволяет достигать достаточной для практического применения степени их ориентирования (в магнитных полях современных ЯМР-спектрометров), а проблемы экспериментального плана затрудняют использование внешнего электрического поля для частичного ориентирования белков. Поэтому в данной работе белок ориентировали, используя анизотропию его взаимодействия с упорядоченной внешней средой (жидкокристаллической матрицей) [19–21].

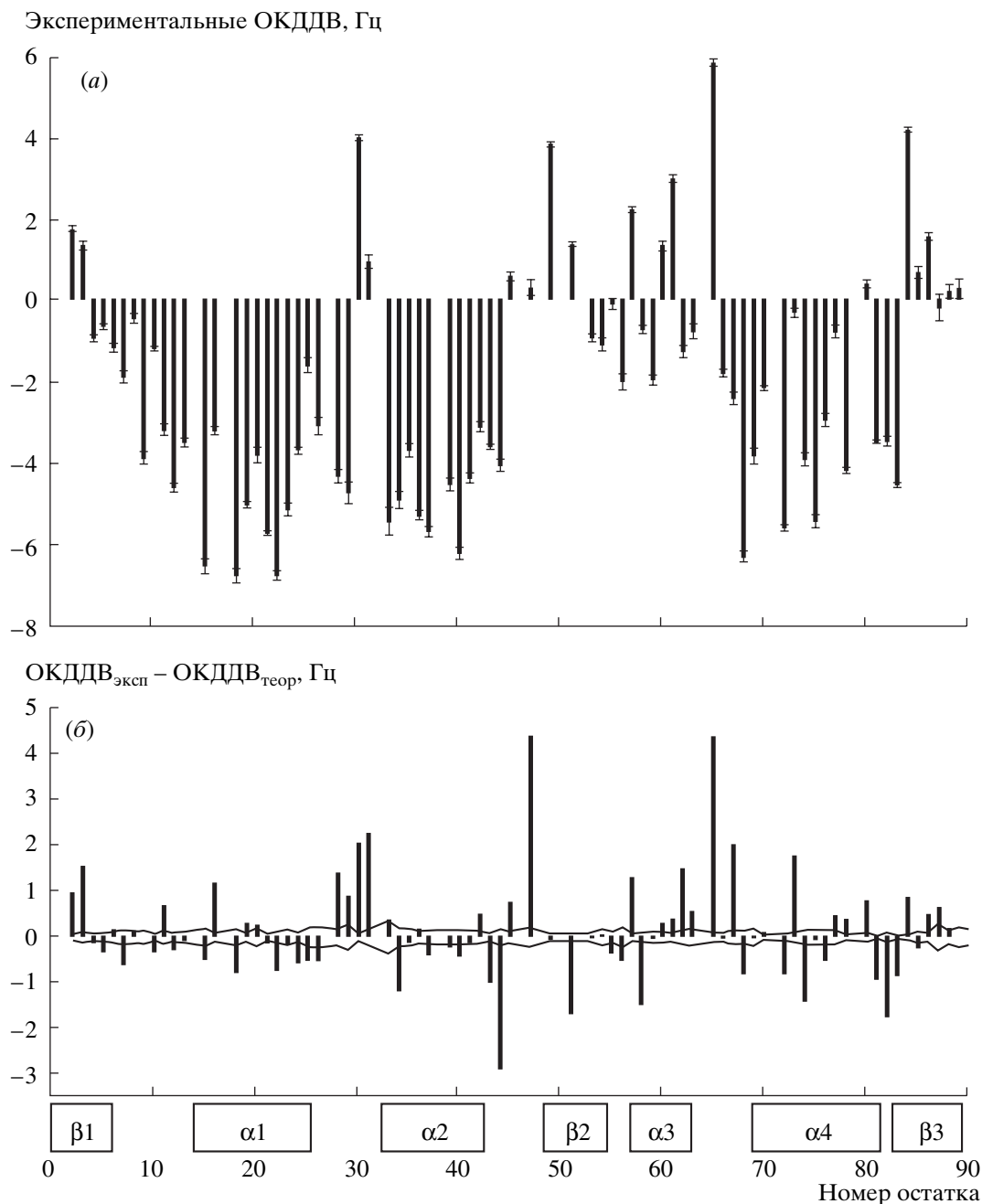
Для демонстрации возможностей и ограничений учета ОКДДВ в структурных исследованиях выбрали  $^{15}\text{N}$ -меченный С40,82А-мутант небольшого ( $M$  около 10.1 кДа) белка – барстара [22], внутриклеточного ингибитора внеклеточной рибонуклеазы барназы из *Bacillus amyloliquefaciens*. Как видно из первого среза спектра  $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ -ЯМР-НСQC барстара (рис. 1а, см. “Эксперимент.



**Рис. 1.** Измерение КДДВ с использованием импульсной последовательности JM-HSQC. (а) Спектр  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  JM-HSQC ( $\Delta = 0.001$  с) 0.24 мМ раствора барстара в 10 мМ калий-фосфатном буфере, рН 6.5, 30°C. Отнесение кросс-пиков указано однобуквенным кодом и номером остатка в аминокислотной последовательности. (б) Зависимость амплитуды (в относительных единицах) кросс-пика Thr42 от задержки  $\Delta$  в эксперименте JM-HSQC.

часть”), подавляющее большинство кросс-пиков  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  не перекрываются, что позволяет произ-

вести измерение остаточных КДДВ для соответствующих пар ядер  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ .



**Рис. 2.** Анализ полученных значений эксп-ОКДДВ. (а) Диаграмма экспериментальных значений  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  ОКДДВ для  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ -групп основной цепи барстара. Приведены значения ОКДДВ и точность их измерения. (б) Разность между экспериментальными и теоретическими ОКДДВ для структуры D в 1B2S. Тонкой линией обозначена область, определяемая ошибками измерения эксп-ОКДДВ.

В настоящей работе были измерены (см. “Эксперимент. часть”) остаточные диполь-дипольные константы  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  для 76 и 87 амидных групп основной цепи белка (см. рис. 2а). Величины этих КДДВ лежат в диапазоне от  $-7$  до  $6$  Гц, а погрешности их измерения составляют  $0.15-0.25$  Гц. Для остальных 9 амидных групп основной цепи барстара КДДВ измерены не были из-за перекрывания или отсутствия сигналов.

*Сравнение экспериментальных и рассчитанных по известным структурам значений ОКДДВ.* Экспериментально измеренные ОКДДВ  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ -групп барстара сравнивали с ОКДДВ, рассчитанными (см. “Эксперимент. часть”) для известных пространственных структур этого белка (взятых из Protein Data Bank (PDB)), см. таблицу. На рис. 2б приведена разница между экспериментальными и теоретическими значениями КДДВ для одной из кри-

Полученные методом РСА или ЯМР структуры барстара (и их разрешение), использованные в данной работе, и среднеквадратичное отклонение (RMSD) измеренных для ориентированного в жидкокристаллической матрице белка С40А,С82А-барстар остаточных КДДВ от теоретических КДДВ, рассчитанных для РСА- или ЯМР-структур

Код PDB	Мутации	Примечания	Метод	Разрешение, Å	RMSD(I) <sup>1</sup> , Гц	RMSD(II) <sup>2</sup> , Гц
1BGS <sup>3</sup>	C40A, C82A	в комплексе с барназой	РСА	2.6	1.05–1.45	0.74–0.79
1B27 <sup>3</sup>	C40A, C82A	в комплексе с барназой	»	2.1	1.32–1.35	0.69–0.84
1BV0 <sup>3</sup>	C40A, C82A	в комплексе с барназой	»	2.1	1.30–1.35	0.67–0.77
1BRS <sup>3</sup>	C40A, C82A	в комплексе с барназой	»	2.0	1.00–1.17	0.66–0.78
1B2U <sup>3</sup>	D36A	в комплексе с барназой K27A	»	2.1	1.27–1.38	0.77–0.86
1B2S <sup>3</sup>	T43A	в комплексе с барназой K27A	»	1.82	1.08–1.20	0.75–0.80
1B3S <sup>3</sup>	Y30F	в комплексе с барназой H102A	»	2.39	1.25–1.47	0.73–0.95
1AY7	дикий тип	в комплексе с РНК-азой Sa	»	1.7	1.14	0.97
1A19	C82A	Димер	»	2.76	1.47	1.10
1BTV <sup>3</sup>	дикий тип		ЯМР	0.42 <sup>4</sup>	1.55–1.82	1.07–1.40
1AB7 <sup>3</sup>	C40A, C82A		ЯМР	0.45 <sup>4</sup>	1.74–2.00	1.15–1.52

<sup>1</sup> RMSD(I) (среднеквадратичное отклонение) теоретических и измеренных ОКДДВ рассчитано с использованием всех N–N-векторов, для которых измерены ОКДДВ.

<sup>2</sup> RMSD(II) теоретических и измеренных ОКДДВ рассчитано для N–N-векторов остатков, содержащихся в элементах вторичной структуры барстара.

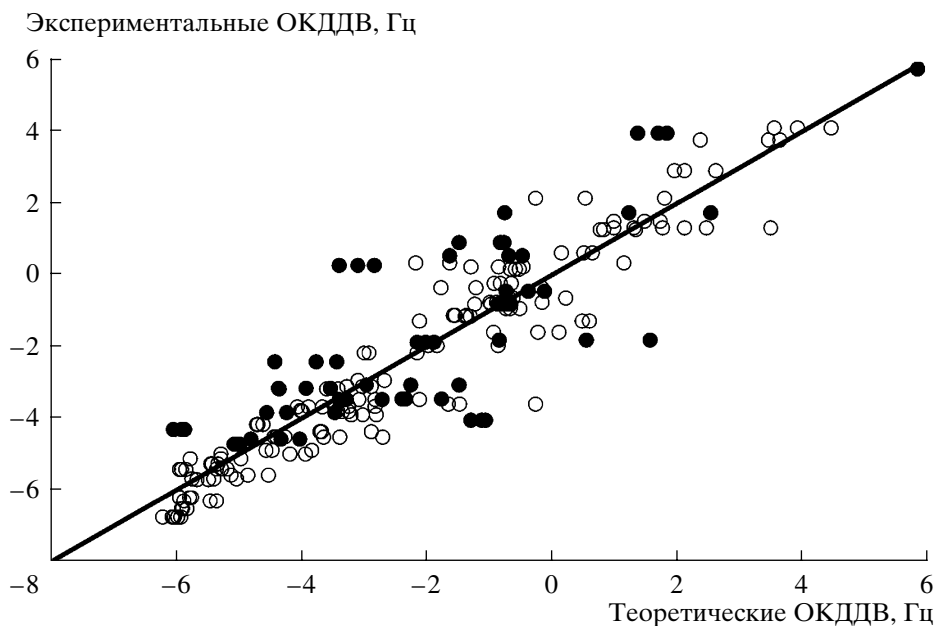
<sup>3</sup> Для структур указан диапазон RMSD, так как единичная кристаллографическая ячейка содержит несколько молекул барстара с различной структурой, а для ЯМР (1BTV и 1AB7) приведен набор 30 структур, удовлетворяющих экспериментальным ограничениям.

<sup>4</sup> Для структур, полученных методом ЯМР, указано среднеквадратичное отклонение атомов основной цепи от средней структуры.

сталлографических структур. Обращает на себя внимание то, что наибольшая разница наблюдается для петлевых участков барстара. По этой причине в таблице приведены среднеквадратичные отклонения (RMSD), рассчитанные как по полному набору данных (RMSD(I)), так и с использованием только остатков, входящих в элементы вторичной структуры (RMSD(II)). Если брать в расчет все остатки, для которых удалось измерить ОКДДВ, то среднеквадратичное отклонение (RMSD(I)) между экспериментальными и рассчитанными значениями для всех структур находится в диапазоне 1.0–2.0 Гц. Если же рассматривать только остатки, находящиеся в элементах вторичной структуры, то RMSD (RMSD(II)) заметно меньше и лежит в диапазоне 0.6–1.5 Гц. Это может объясняться как подвижностью петлевых участков, так и отличиями их структур в кристалле и в растворе. Заметим также, что чем ниже точность определения (разрешение) структуры, тем хуже согласуются рассчитанные и экспериментальные ОКДДВ (таблица). Так, для структур, полученных методом ЯМР (1BTV, 1AB7), корреляция между расч-ОКДДВ и эксп-ОКДДВ хуже, чем для кристаллографических. Среди кристаллографических структур RMSD заметно больше для структуры 1A19, установленной с низким (2.8 Å) разрешением.

На рис. 3 представлена типичная для структур из таблицы корреляционная диаграмма экспериментальных и теоретических ОКДДВ. Значения

экспериментальных ОКДДВ хорошо коррелируют с расчетными (коэффициент корреляции теоретических и экспериментальных КДДВ 0.97), хотя несогласование, достигающее для некоторых остатков во вторичной структуре 2.0 Гц, намного больше, чем ошибка измерения ОКДДВ (0.15–0.25 Гц). Прежде чем переходить к анализу причин этих несогласований, отметим, что, по формуле (3), отклонение значения ОКДДВ при изменении средней ориентации межъядерного вектора ( $\theta$ ,  $\phi$ ) варьируется от 0 до некоторого максимального значения, которое зависит как от направления вектора ( $\theta$ ,  $\phi$ ), так и от изменения его ориентации ( $\Delta\theta$ ,  $\Delta\phi$ ). Тем не менее, остаточные КДДВ чрезвычайно чувствительны к изменениям средней ориентации межъядерного вектора. Так, отклонение средней ориентации вектора на 15° в случае характерных для барстара величин  $D_a \sim -3$  и  $D_r \sim 2$  Гц, согласно формуле (3), может привести к изменению ОКДДВ, достигающему 2 Гц. Принимая во внимание точность измерения (0.15–0.25 Гц), ОКДДВ может чувствовать варьирование средней ориентации вектора  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  порядка 2–3°. Для корректной структурной интерпретации ОКДДВ необходимо учитывать допущения, сделанные при построении теоретической модели. Так, в приведенном выше сравнении экспериментальных и рассчитанных для известных структур барстара  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ -ОКДДВ подразумевалось, что среднее значение длин всех  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ -векторов одинаково, и па-



**Рис. 3.** Корреляционная диаграмма измеренных и рассчитанных для кристаллографической структуры 1BRS  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  ОКДДВ. Незакрашенными кружками обозначены данные для остатков, расположенных в элементах вторичной структуры ( $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -тяжи), закрашенными — для остальных остатков.

раметры порядка, характеризующие внутримолекулярную подвижность векторов, также одинаковы. Однако длина связи Н–N может меняться в пределах  $\pm 0.003 \text{ \AA}$  [23], что может приводить к  $\sim 1\%$ -ной ошибке для теоретического значения ОКДДВ. Для барстара эта ошибка в 3–4 раза меньше ошибки измерения ОКДДВ и поэтому эффектами, связанными с изменениями длины связи  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ , можно пренебречь.

Величина  $S^2$  для различных векторов Н–N в элементах вторичной структуры белков, как правило, лежит в диапазоне 0.85–0.97. С учетом этой неопределенности в значениях параметра порядка ( $S = 0.92$ – $0.98$ ), согласно формуле (5), можно ожидать 3%-ной ошибки в расчете теоретических значений ОКДДВ для достаточно жестких участков молекулы при использовании общего для всех аминокислотных остатков параметра порядка. Для подвижных участков белка можно ожидать заметно большего рассогласования и интерпретировать экспериментальные ОКДДВ следует с большей осторожностью.

Можно показать, что учет подвижности межъядерного вектора шкалированием на параметр порядка (формула (5)) справедлив лишь в отдельных случаях симметрии высоких порядков, например, если вектор колеблется в круговом конусе, ось которого и есть среднее значение вектора. Но даже в случае высокой симметрии движений межъядерного вектора использование параметров порядка, полученных из значений  $T_1$ ,  $T_2$  и NOE на основании “модель-независимого подхода”

[10–12], может приводить к ошибкам. Это связано с тем, что “модель-независимый подход” дает представления о параметрах порядка быстрых движений (наносекундного и пикосекундного диапазона), в то время как остаточные ОКДДВ являются усредненными по более широкому временному диапазону, в том числе и по микро- и миллисекундным движениям. Микро- и миллисекундный конформационный обмен можно задекларировать по зависимости величины  $T_2$  ядра от частоты спектрометра [24] или от амплитуды радиочастотного поля [25], но информацию об амплитуде и характере движений межъядерных векторов получить не удастся. Одна из причин неудачи состоит в том, что конформационный обмен может быть вызван не только подвижностью ядра, но и изменениями в его окружении. Таким образом, учитывать внутреннюю динамику белка посредством уравнения (5) в общем случае некорректно, и надо либо задаваться определенной моделью внутренних движений в молекуле, либо учитывать определенную погрешность в положении среднего вектора при использовании ОКДДВ в расчете структуры белка. На наш взгляд, наиболее правильным способом получения информации о характере и амплитуде внутримолекулярных движений может оказаться применение методов молекулярной динамики. К сожалению, мощности вычислительных машин, имеющихся сегодня, позволяют характеризовать молекулярные движения от пико- до микросекундного диапазонов.

*Структуры барстара, полученные методом ЯМР, и остаточные КДДВ.* Представление структур ЯМР в PDB в виде набора из 20–30 структур, не противоречащих наложенным ограничениям, не позволяет произвести корректного сравнения теоретических и экспериментальных ОКДДВ. Это связано с тем, что в эксперименте измеряется среднее по времени и ансамблю молекул значение ОКДДВ и сравнивать это значение необходимо со средней ОКДДВ для колебаний вектора N–N или хотя бы с ОКДДВ для средней ориентации этого вектора (в случае симметричного распределения). Выборка из 20–30 структур, даже если все они принадлежат области конформационного пространства, реально занимаемого молекулой, недостаточно описывает распределение. Как показывает математическое моделирование, средняя ориентация, рассчитанная по 30 ориентациям вектора, равномерно распределенным в конусе с раствором  $20^\circ$ , может отличаться от истинного среднего значения на величину  $5\text{--}10^\circ$ . Для параметров тензора ориентации барстара ( $D_a \sim -3$  и  $D_r \sim 2$  Гц) это соответствует отклонениям в ОКДДВ на величины до 1 Гц. Математическое моделирование показывает, что для корректного сопоставления эксп- и расч-ОКДДВ желательно иметь как минимум 1000 различных структур, удовлетворяющих экспериментальным данным. Таким образом, точность ЯМР-структур и способ их представления в базах данных, не являются достаточными для детального сравнения ОКДДВ.

*Кристаллографические структуры и остаточные КДДВ.* Вообще говоря, сравнение экспериментальных данных по ОКДДВ барстара с данными кристаллографических исследований также не вполне корректно, так как структура белка в растворе и кристаллах (к тому же, в большинстве случаев не для самого белка барстар, а для его комплекса с различными РНК-азами) могут различаться (см. таблицу). Тем не менее, такое сравнение весьма полезно для понимания возможностей и осознания границ применения ОКДДВ в структурных исследованиях биомолекул.

Покажем, как особенности метода рентгеноструктурного анализа могут влиять на согласованность РСА-структуры с остаточными КДДВ.

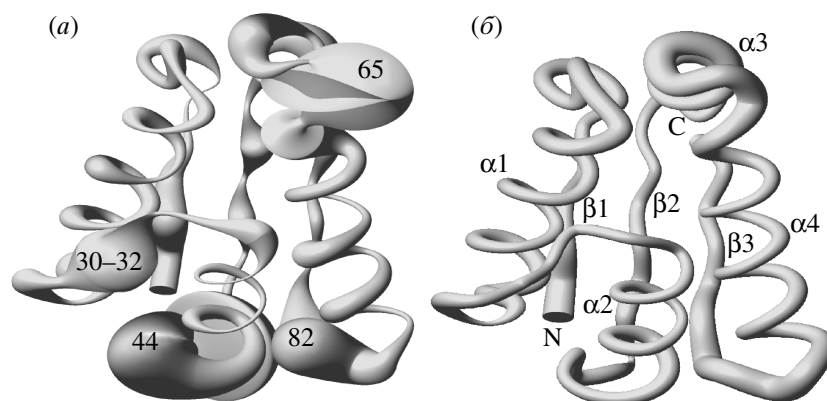
Кристаллографические структуры не содержат координат протонов, и поэтому для расчета ОКДДВ приходится достраивать амидные протоны, используя стандартную геометрию пептидной связи (см. “Эксперимент. часть”). Известно, что достраивание амидных протонов по координатам тяжелых атомов с использованием плоской геометрии пептидной группы вместо реальной может привести к ошибке в ориентации N–N-вектора на величины порядка  $5^\circ$  [17, 23]. Принимая во внимание, что неопределенность в положениях тяжелых (C, N, O)

атомов для кристаллографической структуры с разрешением  $2 \text{ \AA}$  составляет  $0.2 \text{ \AA}$ , вариацией положений атомов пептидной связи можно оценить, что неопределенность в ориентации N–N-вектора при этом составляет  $7^\circ$  в плоскости пептидной связи и  $15^\circ$  в направлении, перпендикулярном этой плоскости. Таким образом, погрешность в ориентации N–N-вектора для кристаллографической структуры с разрешением  $2 \text{ \AA}$  (типичные структуры из таблицы) может достигать  $\sim 20^\circ$ , что в случае барстара приведет к ошибке  $\sim 2$  Гц для теоретической ОКДДВ.

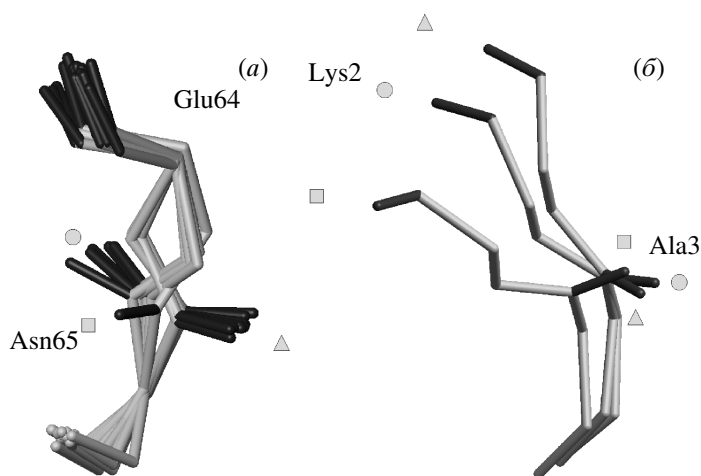
Принимая во внимание значения аксиальной и ромбической компонент тензора ориентации барстара (т.е.  $D_a \sim -3$  и  $D_r \sim 2$  Гц), среднеквадратичное рассогласование экспериментальных данных с кристаллическими структурами в  $1.00\text{--}1.47$  Гц ( $0.66\text{--}1.10$  Гц для элементов вторичной структуры) (см. таблицу) может быть легко объяснено отличиями в ориентации  $^{15}\text{N}$ -векторов в  $10\text{--}15^\circ$ .

Наглядное представление о соответствии пространственной структуры и экспериментальных значений ОКДДВ дано на рис. 4, где в виде трубчатой модели основной цепи молекулы барстара показано расхождение значений теоретических и экспериментальных ОКДДВ ( $\Delta\delta J$ ) для каждого аминокислотного остатка одной из кристаллографических структур барстара (E в 1B2S). Можно было бы ожидать, что  $\Delta\delta J$  должно коррелировать со значениями кристаллографического В-фактора, характеризующего неопределенность в положениях атомов в кристалле. Однако сравнение показывает (рис. 4), что это не так. Следовательно, основной вклад в рассогласование эксп-ОКДДВ с кристаллографическими данными вносит не неточность кристаллографических координат атомов, а различия структур барстара в кристаллах и в растворе. Детальный анализ рассогласования ( $\Delta\delta J$ ) указывает на то, что наиболее существенные отличия между структурами барстара в растворе и кристаллах сосредоточены в зонах кристаллических контактов и петель.

Наибольшие отличия между экспериментальными и теоретическими ОКДДВ ( $4\text{--}8$  Гц, см. рис. 2a) для большинства кристаллических структур наблюдается для остатков Trp30, Trp44 и Trp47, находящихся в зонах кристаллических контактов и для остатка Asn65, находящегося в петле. Тем не менее, для нескольких кристаллографических структур (B в 1AY7, D, E в 1BGS, A, B в 1A19, F в 1BRS), для Asn65 рассогласование между теоретической и экспериментальной ОКДДВ составляет менее 1.5 Гц. На рис. 5a приведена суперпозиция петель 64–66 для всех известных (таблица) кристаллографических структур барстара. Видно, что в кристаллах, в основном, присутствуют две конформации этой петли, одна из которых находится в хорошем соответствии с эксп-ОКДДВ. По-видимому, в



**Рис. 4.** Трубочные модели пространственной укладки основной цепи барстара. Толщина трубки соответствует: (а) расогласованию измеренных и теоретических (рассчитанных из кристаллографической структуры (D в 1B2S) барстара) значений  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -ОКДДВ; (б) V-фактору этой кристаллографической структуры. Цифрами указаны номера остатков, для которых наблюдаются большие расогласования экспериментальных и теоретических ОКДДВ. Указано расположение  $\alpha$ -спиралей ( $\alpha 1$ - $\alpha 4$ ) и  $\beta$ -тяжей ( $\beta 1$ - $\beta 3$ ) барстара.



**Рис. 5.** Суперпозиция основных цепей (а) для участка Glu64–Asn65 всех кристаллографических структур из таблицы (совмещение структур произведено по координатам атомов основной цепи участка 64–66) и (б) для N-концевого участка Lys2–Ala3 трех кристаллографических структур из 1B2S (совмещение структур произведено по координатам атомов основной цепи всех остатков входящих в состав  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -тяжей барстара). Черным цветом окрашены амидные группы, серым – остальные связи основной цепи. Кругами обозначены ориентации Н–Н-векторов, находящиеся в хорошем согласовании с экспериментальными значениями ОКДДВ, квадратиками и треугольниками показаны прочие ориентации.

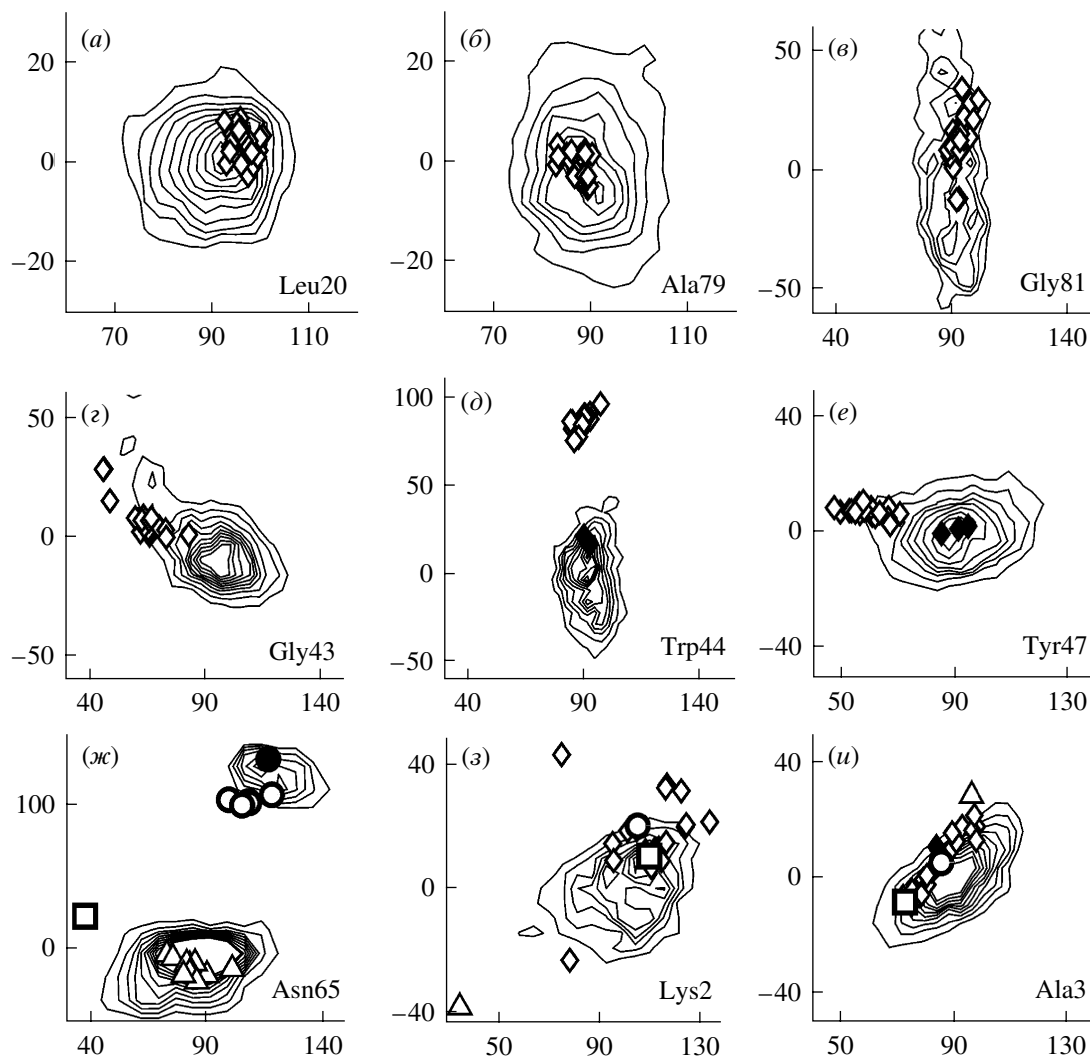
растворе преимущественно заселено именно это конформационное состояние.

В качестве другого примера рассмотрим N-концевые остатки Lys2 и Ala3 барстара. На рис. 5б приведена суперпозиция фрагмента Lys2–Ala3 трех кристаллических структур (все из 1B2S). Видно, что для остатка Lys2 ориентации векторов Н–Н в этих структурах отличаются существенно, а для Ala3 – в меньшей степени. Следует отметить, что одна из этих трех структур (F в 1B2S) находится в хорошем согласовании с эксп-ОКДДВ (значение  $\Delta\delta J$  между экспериментальными ОКДДВ и рассчитанными с использованием

структуры F в 1B2S составляет 0.61 и 0.56 Гц для Lys2 и Ala3 соответственно), в то время как для двух других структур (D, E) расогласование более значительно (–1.0 и 1.7 Гц для Lys2 и –1.5 и 1.9 Гц для Ala3). Разумно предположить, что средняя ориентация Н–Н-векторов в остатках Lys2 и Ala3 в растворе близка к их ориентациям в структуре F в 1B2S.

*Сравнение экспериментальных ОКДДВ с ОКДДВ, рассчитанными с учетом результатов моделирования молекулярной динамики барстара.* Результаты молекулярно-динамических расчетов хорошо коррелируют с кристаллографически-





**Рис. 6.** Контурные карты плотности вероятности ориентации векторов N–H (в угловых координатах) остатков Leu20 (а), Ala79 (б), Gly81 (в), Gly43 (з), Trp44 (д), Tyr47 (е), Asn65 (ж), Lys2 (з) и Ala3 (и) барстара, построенные на основе данных молекулярной динамики. Ромбиками обозначены ориентации этих векторов в кристаллографических структурах из таблицы. Заполненными ромбиками на (д), (е), (з) и (и) и заполненным кружком на (ж) обозначены ориентации N–H-векторов, обеспечивающие наилучшее согласование с экспериментальными ОКДДВ. Треугольники, квадраты и кружки на (ж) указывают ориентации в структурах в соответствии с рис. 5а, а на (з, и) – в соответствии с рис. 5б.

ми структурами. Для малоподвижных участков молекулы плотности вероятности ориентации N–N-векторов, полученные из 1.6 нс-молекулярно-динамической траектории барстара [26] (см. “Эксперимент. часть”) и распределение ориентаций этих векторов в кристаллографических структурах, как правило, не обладают сильной асимметрией и могут быть с хорошей точностью аппроксимированы симметричными коническими распределениями с дисперсией 10–15° (см. рис. 6а, б). Для аминокислотных остатков, обладающих большей подвижностью, молекулярная динамика в большинстве случаев хорошо воспроизводит форму и размер области ориентаций, доступных N–N-вектору в кристаллографических структурах барстара (рис. 6в, з), хотя сама область высокой плотно-

сти вероятности может быть существенно смещена относительно распределения ориентаций в кристаллографических структурах (рис. 6г).

Экспериментальные ОКДДВ находятся в хорошем соответствии с результатами молекулярно-динамических расчетов, что наиболее наглядно можно продемонстрировать на примере остатков Trp44 и Tyr47. Для обоих остатков наблюдается большое (>40°) смещение распределения ориентаций N–N-вектора в кристаллографических структурах относительно молекулярно-динамической плотности вероятности (рис. 6д, е). Тем не менее, для структур А и В из 1A19 (отмечены заполненными ромбиками на рис. 6д, е) и F из 1B2S (рис. 6е) наблюдается хорошее согласование как с молекулярно-динамическими расчетами, так и с экспери-

ментальными значениями ОКДДВ ( $\Delta\delta J < 0.5$  Гц). Для остальных структур отличие расчетных и экспериментальных ОКДДВ составляет более 2 Гц и достигает 8 Гц. Вероятнее всего, существенное рассогласование эксп-ОКДДВ с большинством кристаллографических структур объясняется кристаллическими контактами рассматриваемых аминокислотных остатков. Для структур из 1A19 такие кристаллические контакты отсутствуют [27], и наблюдается хорошее соответствие экспериментальных и теоретических ОКДДВ.

Интерес представляют участки молекулы, для которых наблюдаются наибольшие расхождения в разных кристаллографических структурах. К таким участкам можно отнести петлю 63–67 (см. рис. 5а), для которой в 6 из 24 структур отсутствуют координаты атомов, и N-концевые остатки (см. рис. 5б). На рис. 6ж–и приведены данные для ориентации N–N-векторов остатков Asn65, Lys2 и Ala3 в различных кристаллографических структурах. Все, кроме одной, ориентации вектора N–N остатка Asn65 (рис. 6ж) в кристаллах соответствуют двум наиболее вероятным областям ориентаций данного вектора, полученным при моделировании молекулярной динамики, что дает еще один пример адекватного описания области доступных ориентаций межъядерного вектора методами молекулярной динамики. Примечательно, что ориентация вектора N–N в структуре F из 1BRS (отмечена заполненным кружком на рис. 6ж) расположена вблизи одного из максимумов плотности вероятности динамической траектории и находится в отличном согласии с экспериментальным значением ОКДДВ ( $\Delta\delta J = 0.1$  Гц). По-видимому, это состояние барстара является наиболее заселенным в условиях измерения ОКДДВ.

Для N-концевых остатков (Lys2 и Ala3) наблюдается заметное смещение распределения ориентаций N–N-векторов в кристаллографических структурах относительно молекулярно-динамической плотности вероятности (рис. 6з, и). На рис. 6 заполненными ромбиками указаны ориентации N–N-векторов тех кристаллографических структур, которые наилучшим образом согласуются с остаточными КДДВ. Для кристаллографической структуры F из 1B2U (ориентация вектора N–N остатка Lys2 отмечена заполненным ромбиком на рис. 6з) величина  $\Delta\delta J$  составляет 0.4 Гц, а для остатка Ala3 в структуре F из 1B2U (рис. 6и)  $\Delta\delta J = 0.03$  Гц. Для этих аминокислотных остатков центр распределения ориентаций N–N-векторов в кристаллографических структурах лучше согласуется с ОКДДВ, чем максимум плотности вероятности молекулярно-динамических расчетов, хотя размер и форма обоих распределений схожи (рис. 6з, и).

Таким образом, построенные по молекулярно-динамической траектории карты плотностей ве-

роятности ориентации N–N-векторов хорошо воспроизводят форму и размер конформационного пространства для подавляющего большинства аминокислотных остатков и могут быть использованы для корректного усреднения ОКДДВ при учете динамики белков в тех случаях, когда использование формулы (5) неправомерно.

С учетом проведенного в настоящей работе анализа, процедура использования ОКДДВ для уточнения пространственной структуры белков может быть построена следующим образом:

1. Уточнение пространственной структуры белка с использованием ОКДДВ только тех аминокислотных остатков, для которых по данным релаксационных измерений не наблюдается значительных отклонений от среднего значения параметров порядка и отсутствует конформационный обмен в микро- и миллисекундном диапазоне времен, а результаты молекулярно-динамических расчетов указывают на высокую симметрию движений межъядерных векторов. В качестве стартовой структуры для молекулярно-динамических расчетов следует использовать структуру, подлежащую уточнению. Учет внутримолекулярной подвижности шкалированием на среднее значение параметра порядка  $S$  (см. формулу (5)) произойдет автоматически шкалированием параметров тензора ориентации ( $D_a$  и  $D_r$ ) при их оптимизации.

2. Итеративное уточнение средней ориентации межъядерных векторов прочих остатков с использованием установленных на предыдущем этапе параметров тензора ориентации. При этом расчет значения ОКДДВ следует производить усреднением с использованием распределения плотности вероятности ориентации межъядерного вектора (форма и размер), полученного при молекулярно-динамических расчетах. В качестве стартовой структуры для молекулярно-динамических расчетов следует использовать структуру, полученную на этапе 1.

### Выводы

Экспериментальные значения остаточных КДДВ для белка барстар удовлетворительно согласуются как с известными кристаллографическими структурами барстара, так и с результатами моделирования молекулярной динамики белка. Неидеальное согласование кристаллографических структур с остаточными КДДВ объясняется ограниченной точностью кристаллографических структур, внутримолекулярной подвижностью и различиями структур в растворе и в кристалле. Структуры, полученные на основе стандартных данных спектроскопии ЯМР (ЯЭО, КССВ), заметно хуже согласуются с ОКДДВ, чем структуры, полученные методом РСА. Ввиду отсутствия экспериментальной информации о симметрии внутримолекулярных

движений межъядерных векторов наиболее корректным способом учета внутренней динамики молекул при интерпретации ОКДДВ представляется совместное использование ОКДДВ, стандартных данных спектроскопии ЯМР (ЯЭО и КССВ) и результатов молекулярно-динамических расчетов. Это позволит заметно улучшить качество пространственных структур, получаемых методом ЯМР.

Остаточные КДДВ частично ориентированных макромолекул могут достоверно обнаруживать малые ( $\sim 2\text{--}3^\circ$ ) изменения средней ориентации межъядерных векторов и, таким образом, чрезвычайно перспективны для изучения взаимодействий белок-лиганд и влияния различных факторов на структуру макромолекул.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

#### Получение $^{15}\text{N}$ -меченного С40,82А барстара.

Для получения  $^{15}\text{N}$ -меченного мутанта С40,82А барстара [22] использовали культуру *E. coli* BL21(DE3), содержащую плазмиду рGEMEX1 с геном барстара [28]. Выращивание культуры проводили на среде М9, содержащей в качестве источника азота  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ . Клетки осаждали центрифугированием при 5000 об/мин, 10 мин,  $4^\circ\text{C}$ . Осадок ресуспендировали в буфере А: 50 мМ Трис- $\text{HCl}$ , рН 8,0, содержащем 1,0 мМ EDTA, 1 мМ PMSF, 8 мМ  $\text{NaN}_3$ , и разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе. Клеточный дебрис отделяли центрифугированием 20 мин при 15000 об/мин и  $4^\circ\text{C}$ . Из полученного супернатанта белки дробно высаливали сульфатом аммония. Барстар содержался во фракции, полученной при 40–80% насыщении. Осадок растворяли в небольшом количестве буфера А и наносили на колонку ( $2,5 \times 100$  см) с сефадексом G-75 (Pharmacia), предварительно уравновешенную буфером А. На следующей стадии использовали анионообменную хроматографию на колонке Mono Q HR10/10 (Pharmacia), уравновешенную буфером А. Элюцию барстара проводили в линейном градиенте концентрации  $\text{NaCl}$  от 0 до 0,5 М в буфере А. Белок выходил при концентрации около 0,3 М  $\text{NaCl}$ . Элюат концентрировали до 1 мл в ультрафильтрационной ячейке “Amicon” с мембраной РВСС Biomax-5 (Millipore). На последней стадии очистки раствор белка наносили на колонку ( $1,0 \times 100$  см) с сефадексом G-75 (Pharmacia), предварительно уравновешенную буфером Б: 10 мМ калий-фосфатный буфер, рН 6,5, содержащий 8 мМ  $\text{NaN}_3$ . Фракции с барстаром объединяли и концентрировали до 12 мг/мл. С 1 л культуральной жидкости получали до 40 мг очищенного  $^{15}\text{N}$ -барстара.

**Приготовление образцов.** Для создания жидкокристаллической матрицы использовали смесь дигексаноилфосфатидилхолина (ДНРС) и димиристоилфосфатидилхолина (DMPC) (Sigma). Согласно работе [29], 5–15% раствор в воде этих ли-

пидов при молярных соотношениях DMPC : ДНРС в диапазоне 2 : 1–4 : 1 и температуре  $25\text{--}35^\circ\text{C}$  образует взвесь дискоидных мицелл (бицелл) диаметром  $\sim 1000 \text{ \AA}$  и толщиной  $\sim 40 \text{ \AA}$ . Диаметр бицелл и расстояние между ними можно менять в некотором диапазоне, изменяя соотношение DMPC : ДНРС (предположительно, в бицеллах молекулы DMPC образуют бислой, а молекулы ДНРС образуют “ребро” диска) и общую концентрацию липидов. Такие бицеллы выстраиваются поверхностью диска параллельно магнитному полю из-за сильной собственной анизотропии магнитной восприимчивости и жидкокристаллических свойств системы, что контролируется методами  $^2\text{H}$ - и  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектроскопии [30].

Смесь DMPC и ДНРС, молярное соотношение 2,9 : 1 (общая концентрация липидов 7% по весу), растворяли в 50 мМ фосфатном буфере, рН 6,5. Раствор многократно (5–10 раз) нагревали в водяной бане до  $80^\circ\text{C}$ , перемешивали, охлаждали до  $-10^\circ\text{C}$  и добавляли к лиофилизованному препарату барстара (расчетная концентрация белка 13 мг/мл).

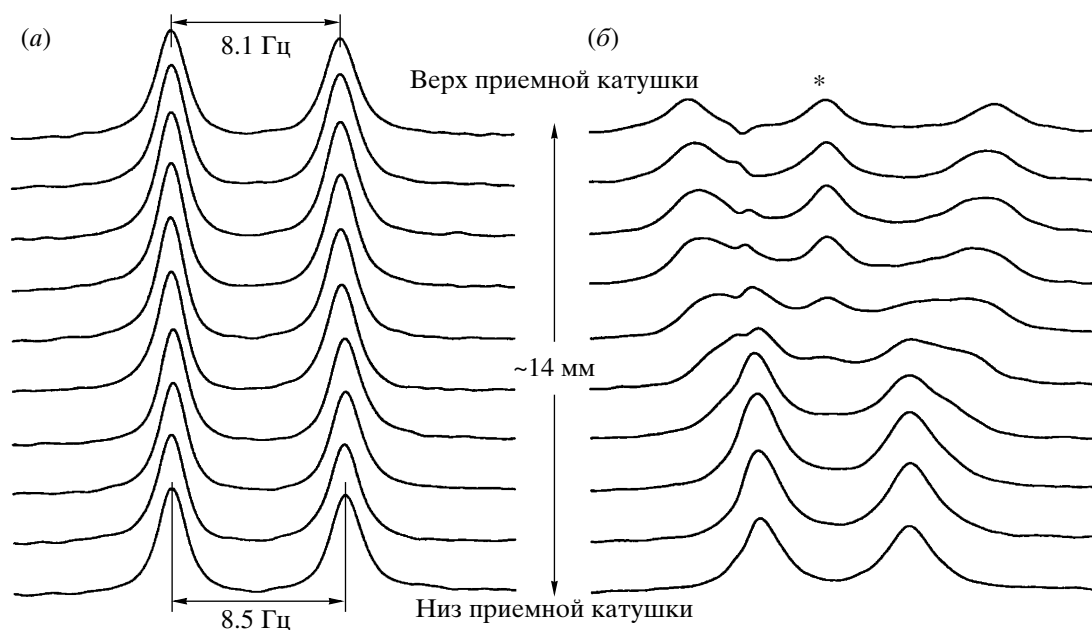
**Спектроскопия ЯМР.** Все эксперименты проводили на спектрометре Varian Unity 600 (США) с частотой протонного резонанса 600 МГц.

Температура образца ( $30^\circ\text{C}$ ) обеспечивала его стабильность и достаточную степень ориентирования белка. Существование анизотропной жидкокристаллической фазы удобнее всего наблюдать по расщеплению квадрупольного дублета сигнала дейтерия растворителя (см., например, рис. 7а), при этом величина расщепления пропорциональна степени ориентации. Анизотропную жидкокристаллическую фазу наблюдали также по спектрам  $^{31}\text{P}$  (данные не приведены) как описано в работах [30–32].

Наблюдаемые константы спин-спинового взаимодействия ( $J_{\text{eff}}$ )  $^{1}\text{H}$ – $^{15}\text{N}$  амидных групп белка в ориентированном и неориентированном состоянии получали, используя импульсную последовательность JM-HSQC [17]. В этом эксперименте снимается серия двумерных корреляционных спектров  $^{15}\text{N}$ – $^1\text{H}$ , в которых амплитуды кросс-пиков А зависят от временного интервала  $\Delta$ , изменяемого от спектра к спектру, как

$$A(\Delta) = A_0 \exp(-2R\Delta) \cos(2\pi J_{\text{eff}}\Delta) \prod_k \cos(2\pi j_k \Delta), \quad (6)$$

где  $A_0$  – начальная амплитуда пика,  $R$  – эффективная скорость релаксации,  $J_{\text{eff}}$  – наблюдаемая КССВ  $^{1}\text{H}$ – $^{15}\text{N}$ , включающая в себя спин-спиновое и диполь-дипольное взаимодействия,  $\prod_k \cos(2\pi j_k \Delta)$  – множители, учитывающие скалярные спин-спиновые взаимодействия  $^{15}\text{N}$  с другими ядрами (в первую очередь  $^1\text{H}^\alpha$  и  $^1\text{H}^\beta$ ). Ввиду малости величин  $j_k$  ( $< 5$  Гц) по сравнению с  $J_{\text{eff}}$  ( $\sim 92$  Гц), множи-



**Рис. 7.** Спектры  $^2\text{H}$ -ЯМР растворителя ( $\text{D}_2\text{O}$ ) в различных участках образца 1.2 мМ раствора барстара в 50 мМ калий-фосфатном буфере, рН 6.5, 7% DMPC/DHPC (2.9 : 1),  $30^\circ\text{C}$ . (а) Для гомогенного образца (расщепление дублета, а следовательно, и степень ориентации в нижней и верхней частях образца отличается на  $\sim 5\%$ ). (б) Для гетерогенного, расщелившегося на несколько фаз образца, непригодного для измерения остаточных КДДВ, звездочкой отмечен сигнал дейтерия в изотропной фазе.

тель  $\prod_k \cos(2\pi j_k \Delta)$  можно заменить на  $\cos(2\pi j_{\text{eff}} \Delta)$  или вообще опустить практически без потери точности определения  $J_{\text{eff}}$ . Параметры  $A_0$ ,  $R$ ,  $J_{\text{eff}}$  и  $j_{\text{eff}}$  для каждого аминокислотного остатка получали путем согласования уравнения (6) методом наименьших квадратов по алгоритму Левенберга-Марквардта, как описано в работе [33], с экспериментальными зависимостями амплитуд кросс-пиков в спектрах JM-HSQC от  $\Delta$  (см. рис. 1б).

Так как неоднородность образца и его нестабильность во времени являются источником погрешности в измерении ОКДДВ, то их следует контролировать. С этой целью регистрировали спектр  $^2\text{H}$ -ЯМР от узкой ( $\sim 0.5$ – $1.0$  мм) области образца между двумя плоскостями, перпендикулярными направлению магнитного поля спектрометра как описано в работе [34]. На рис. 7 приведены спектры  $^2\text{H}$ -ЯМР растворителя от разных слоев образца в ампуле. Величина расщепления дублета характеризует степень ориентирования в образце. Как видно из рис. 7а, различие в степени ориентирования в рабочем объеме образца составляет около 5% (для сравнения на рис. 7б показан типичный результат для расщелившегося, неоднородного образца). Стабильность образца контролировали, измеряя величины расщепления квадрупольного дублета сигнала дейтерия растворителя до и после съемки спектров JM-HSQC, которая длилась около суток. За это время сте-

пень ориентирования (величина расщепления дейтериевого дублета растворителя) менялась примерно на 8%. Небольшая неоднородность образца (5–10%) не должна сказываться на интерпретации ОКДДВ, так как это приводит к одинаковому шкалированию всех экспериментальных значений. Нестабильность ориентирования во время серии JM-HSQC-экспериментов может приводить к систематической ошибке. Для устранения такой систематической ошибки задержки  $\Delta_1, \dots, \Delta_N$  ( $\Delta_1 = 1$  мс,  $\Delta_N \sim 50$  мс) в серии JM-HSQC-экспериментов располагались в следующем порядке:  $\Delta_1, \Delta_N, \Delta_2, \Delta_{N-1}, \dots$ .

$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -ОКДДВ,  $\delta J$  (рис. 2) получали вычитанием из КССВ в ориентированном состоянии КССВ в неориентированном состоянии барстара (см. формулу (1)). В качестве ориентированного состояния использовали образец барстара в суспензии бицелл при  $30^\circ\text{C}$ . В качестве неориентированных состояний использовали образец барстара в суспензии бицелл при  $26^\circ\text{C}$  (изотропная фаза) и раствор барстара в воде при 30 и  $26^\circ\text{C}$ . Для каждого аминокислотного остатка барстара значения констант спин-спинового взаимодействия  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  ( $J_{\text{eff}}$ ) во всех неориентированных состояниях оказались одинаковыми в пределах погрешности их измерения (0.10–0.25 Гц). Это, а также отсутствие изменений химических сдвигов сигналов барстара, вызванных добавлением в образец липидов, свидетельствует об отсутствии специфических

взаимодействий между барстаром и липидами и об идентичности структуры барстара в воде и в суспензии билипидных мицелл.

**Сравнение эксп-ОКДВ с ОКДВ, рассчитанными по известным структурам**, проводили оптимизацией методом наименьших квадратов по алгоритму Левенберга–Марквардта параметров тензора ориентации ( $D_{xx}$ ,  $D_{yy}$  и эйлеровых углов, задающих тензор в молекулярной системе координат), используя программу, специально созданную для этих целей в нашей лаборатории. Для структур, полученных методом РСА, предварительно с помощью программы “MOLMOL” [35] надстраивали протоны.

**Молекулярная динамика.** Использовали молекулярно-динамическую траекторию барстара из работы [26]. Характеристики молекулярной динамики: старт со структуры 8 из 1ВТВ (утановлена методом ЯМР, см. таблицу), поле CHARMM, стохастические граничные условия; молекулу барстара помещали в сферу диаметром 50 Å, содержащую 1800 молекул воды; длины связей, содержащих протон, фиксировали по алгоритму “shake”; температура 300 К. Длина траектории 1600 пс, шаг 1 фс, координаты записывали каждую 1 пс.

Из этих 1600 структур для каждого остатка были получены плотности вероятности ориентации Н–N-векторов в молекулярной системе координат барстара. Совмещение молекулярной системы координат динамической траектории и системы координат кристаллографических структур осуществляли поворотом системы координат кристаллографической структуры таким образом, чтобы среднеквадратичное отклонение ориентаций Н–N-векторов в кристаллографической структуре от средних по динамической траектории было минимальным. Для остатков, находящихся в малоподвижных участках молекулы ( $\beta$ -тяжи и  $\alpha$ -спирали), такая процедура, как правило, обеспечивала хорошее согласование карты плотности с кристаллографическими структурами. Для подвижных фрагментов (например, N-концевые остатки Lys2, Ala3 и петлевые остатки 64–66) карта плотности вероятности хорошо описывала разброс ориентаций Н–N-векторов в структурах, но была смещена. По-видимому, молекулярно-динамическая траектория, отражая, в основном, характер и амплитуду подвижности Н–N-векторов, в значительной степени зависит от стартовой структуры.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 05-04-49342-а), грантом Президента РФ на поддержку ведущих научных школ и программой РАН “Физико-химическая биология”. Благодарим М.Я. Рейбарха за предоставление отнесе-

ния кросс-пиков в  $^{15}\text{N}$ – $^1\text{H}$ -HSQC-спектре белка барстар.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Noggle J.H., Schirmer R.E.* The Nuclear Overhauser Effect. New York: Acad. Press, 1971.
2. *Bystrov V.F.* // Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. 1980. V. 10. P. 41–81.
3. *Cordier F., Rogowski M., Grzesiek S., Bax A.* // J. Magn. Reson. B. 1999. V. 140. P. 510–512.
4. *Giesen A.W., Homans S.W., Brown J.M.* // J. Biomol. NMR. 2003. V. 25. P. 63–71.
5. *Du Z., Yu J., Ulanov N.B., Andio R., James T.L.* // Biochemistry. 2004. V. 43. P. 11959–11972.
6. *Carbajo R.J., Silvester J.A., Runswick M.J., Walker J.E., Neuhaus D.* // J. Mol. Biol. 2004. V. 342. P. 593–603.
7. *Garcia-Mayoral M.F., Pantoja-Uceda D., Santoro J., Martinez del Pozo A., Gavilanes J.G., Rico M., Bruix M.* // Eur. Biophys. J. 2005. V. 34. P. 1057–1065.
8. *van Dijk A.D.J., Fushman D., Bonvin A.M.J.J.* // Proteins: Struct. Funct. Bioinform. 2005. V. 60. P. 367–381.
9. *Bouvignies G., Bernado P., Blackledge M.* // J. Magn. Reson. 2005. V. 173. P. 328–338.
10. *Lipari G., Szabo A.* // J. Am. Chem. Soc. 1982. V. 104. P. 4546–4559.
11. *Lipari G., Szabo A.* // J. Am. Chem. Soc. 1982. V. 104. P. 4559–4570.
12. *Clore G.M., Szabo A., Bax A., Kay L.E., Driscoll P.C., Gronenborn A.M.* // J. Am. Chem. Soc. 1990. V. 112. P. 4989–4991.
13. *Tjandra N., Omichinski J.G., Gronenborn A.M., Clore G.M., Bax A.* // Nat. Struct. Biol. 1997. V. 4. P. 732–738.
14. *Ramirez B., Bax A.* // J. Am. Chem. Soc. 1998. V. 120. P. 9106–9107.
15. *Demene H., Tsan P., Gans P., Marion D.* // J. Phys. Chem. 2000. V. 104. P. 2559–2569.
16. *Tolman J.R., Flanagan J.M., Kennedy M.A., Prestegard J.H.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 9279–9283.
17. *Tjandra N., Grzesiek S., Bax A.* // J. Am. Chem. Soc. 1996. V. 118. P. 6264–6272.
18. *Huis L., de Kanter F.J.J., MacLean C.* // Mol. Phys. 1991. V. 73. P. 1077–1083.
19. *Meier S., Guthe S., Kiefhaber T., Grzesiek S.* // J. Mol. Biol. 2004. V. 344. P. 1051–1069.
20. *Trempe J.F., Morin F.G., Xia Z., Marchessault R.H., Gehring K.* // J. Biomol. NMR. 2002. V. 22. P. 83–87.
21. *Ottiger M., Bax A.* // J. Biomol. NMR. 1998. V. 12. P. 361–372.
22. *Hartley R.W.* // TIBS. 1989. V. 14. P. 450–454.
23. *Buck M., Karplus M.* // J. Am. Chem. Soc. 1999. V. 121. P. 9645–9658.
24. *Wagner G.* // Current Opinion in Structural Biology. 1993. V. 3. P. 748–754.
25. *Orekhov V.Yu., Pervushin K.V., Arseniev A.S.* // Eur. J. Biochem. 1994. V. 219. P. 887–896.

26. Golovanov A.P., Volynsky P.E., Ermakova S.B., Arseniev A.S. // *Protein Engineering*. 1999. V. 12. P. 31–40.
27. Ratnaparkhi G.S., Ramachandran S., Udgaonkar J.B., Varadarajan R. // *Biochemistry*. 1999. V. 37. P. 6958–6966.
28. Protasevich I.I., Schulga A.A., Vasilieva L.I., Polyakov K.M., Lobachov V.M., Hartley R.W., Kirpichnikov M.P., Makarov A.A. // *FEBS Lett.* 1999. V. 445. P. 384–388.
29. Prestegard J.H., Al-Hashimi H.M., Tolman J.R. // *Q. Rev. Biophys.* 2000. V. 33. P. 371–424.
30. Sanders II, C.R., Schwonek J.P. // *Biochemistry*. 1992. V. 31. P. 8898–8905.
31. Sanders II, C.R., Prestegard J.H. // *Biophys. J.* 1990. V. 58. P. 447–460.
32. Speyer J.B., Spirada P.K., Das Gupta S.K., Shipley G.G., Griffin R.G. // *Biophys. J.* 1987. V. 51. P. 687–691.
33. Press W.H., Teukolsky S.A., Vetterling W.T., Flannery B.P. *Numerical Recipes in Fortran: The Art Scientific Computing*. New York: Cambridge Univ. Press, 1992.
34. Ernst R.R., Bodenhausen G., Wokaun A. *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*. Oxford: Clarendon Press, 1987.
35. Koradi R., Billeter M., Wuthrich K. // *J. Mol. Graphics*. 1996. V. 14. P. 51–55.

## Residual Dipolar Couplings and Molecular Dynamic Calculations as a Source for Refinement of Protein Spatial Structures

E. V. Tishchenko<sup>a</sup>, A. G. Sobol'<sup>a</sup>, S. A. Krachkovsky<sup>a, b#</sup>, L. I. Vasil'eva<sup>a</sup>, S. B. Nol'de<sup>a</sup>,  
A. A. Shul'ga<sup>a</sup>, M. P. Kirpichnikov<sup>a</sup>, and A. S. Arseniev<sup>a</sup>

<sup>#</sup>Phone: +7 (495) 330-7483; fax: +7 (495) 335-5033; e-mail: serega@nmr.ru

<sup>a</sup> Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997 Russia

<sup>b</sup> Moscow Institute of Physics and Technology, Institutskii per. 9, Dolgoprudny, Moscow oblast, 141700 Russia

The precision of techniques and factors affecting the interpretation of residual dipolar couplings (RDCs) in analysis of spatial structures of partially aligned proteins are discussed. Experimental RDC values were obtained for pairs of <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N nuclei of the protein barstar partially aligned in a liquid crystalline matrix of bicelles composed of dimiristoylphosphatidylcholine and dihexanoylphosphatidylcholine. The observed couplings agree well with the spatial structures of barstar determined earlier by X-ray and NMR methods. However, the differences between the experimental and calculated RDCs that were calculated on the basis of the known spatial structures of barstar, exceed the experimental errors three- to fourfold. These discrepancies can be explained by differences in the protein structures in solution and in crystal, a limited precision of the X-ray analysis, and the intramolecular mobility of the protein molecule. A comparison of the results of modeling of the molecular dynamics of barstar in solution, crystal structures, and the experimental RDCs showed that the methods of molecular dynamics provide for a reasonable description of the character and amplitudes of internal motions and they should be considered for the correct determination of protein spatial structures from NMR spectroscopic data. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2006, vol. 32, no. 6; see also <http://www.maik.ru>

*Key words:* proteins, spatial structure, NMR, residual dipolar couplings