



УДК 577.112.012.7:543.422.25:577.322.5

ПРИНЦИПЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА  
ДВУМЕРНЫХ СПЕКТРОВ ЯДЕРНОГО ЭФФЕКТА ОВЕРХАУЗЕРА  
ПРИ ПОСТРОЕНИИ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ  
ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ

Соболь А. Г., Арсеньев А. С.

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

Для выяснения возможностей использования количественной информации, содержащейся в двумерных спектрах  $^1\text{H}$ -ЯМР типа NOESY, для определения пространственной структуры пептидов и белков рассмотрено влияние экспериментальных факторов и свойств исследуемой системы на интегральную интенсивность (объем) кросс-пиков ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО). Проведен анализ экспериментальных факторов, определяющих погрешность в измерении объемов кросс-пиков и предложены рекомендации, позволяющие учесть неравновесное состояние спиновой системы перед началом импульсной последовательности NOESY. На основе полной матрицы релаксации протонов правой  $\pi_{LD}^{6,3}$  и  $\pi_{LD}^{6,3}$ -спирали грамицидина А рассмотрено влияние свойств исследуемой системы (времен спин-решеточной релаксации, времени вращательной корреляции молекулы  $\tau_c$ , наличия в молекуле большого числа взаимодействующих магнитных ядер). Показано, что в пределах возможной погрешности измерения времена неселективной продольной релаксации ( $T_1$ ) протонов слабо сказываются на результатах математического моделирования объемов кросс-пиков. Наибольшее влияние оказывают время корреляции ( $\tau_c$ ) и окружающие протоны. Тем не менее расчеты, основанные на использовании матрицы релаксации протонов дипептидного фрагмента, хорошо отражают объемы кросс-пиков ЯЭО между протонами NH,  $\text{C}^{\alpha}\text{H}$  и  $\text{C}^{\beta}\text{H}$  соседних по аминокислотной последовательности остатков при временах обмена компонент намагниченности ( $\tau_m$ ), обеспечивающих максимальное отношение сигнал/шум в NOESY-спектрах.

Спектроскопия ЯМР широко используется для определения пространственной структуры биополимеров — пептидов, белков, олигонуклеотидов в растворе [1—3]. Информацию о структуре молекул получают главным образом из констант спин-спинового взаимодействия (KCCB) ядер, ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) и скоростей обмена лабильных атомов водорода с растворителем. Особую роль в установлении пространственной структуры молекул играет ЯЭО [4], так как он дает информацию о взаимном расположении магнитных ядер и их подвижности. Для изучения биополимеров одномерные методики ЯЭО практически неприменимы из-за большого числа сигналов и их перекрывания, поэтому используется двумерная (2D) спектроскопия ЯЭО (NOESY) [5, 6].

Хотя интегральная интенсивность (объем) кросс-пиков в гомоядерных NOESY-спектрах непосредственно связана со структурой и динамикой молекул [6, 7], до настоящего времени используется преимущественно качественная информация. Наличие кросс-пика в протонном NOESY-спектре обычно интерпретируется как сближенность протонов на расстоянии менее 4 Å. Такое положение во многом обусловлено отсутствием всестороннего анализа факторов, влияющих на объемы кросс-пиков в NOESY-спектрах. Можно ожидать, что переход к использованию количественной информации, содержащейся в NOESY-спектрах, существенно улучшит возможности изучения структуры и динамики молекул.

В данной работе поставлена цель рассмотреть, как различные факторы могут влиять на объемы кросс-пиков в протонных NOESY-спектрах, точность их измерения и на погрешности математического моделирования объемов кросс-пиков. Кроме того, рассматривается вопрос о возможности использования различных упрощенных математических моделей при опре-

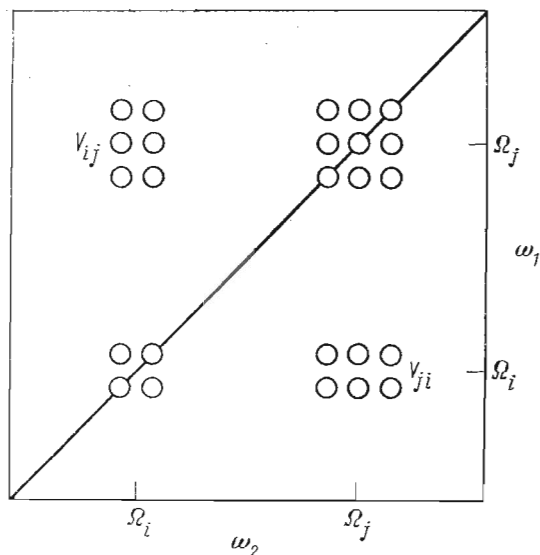


Рис. 1. Схематическое изображение NOESY-спектра для двух пространственно близких магнитных ядер, сигналы от которых имеют разную мультиплетность, обусловленную скалярным спин-спиновым взаимодействием с другими ядрами

делении пространственной структуры полипептидов.

Рассмотрим схему гомоядерного NOESY-эксперимента. Импульсная последовательность NOESY состоит из трех неселективных  $90^\circ$ -градусных радиочастотных импульсов и имеет вид [5]:

$$(Q - 90^\circ - t_1 - 90^\circ - \tau_m - 90^\circ - t_2)_L, \quad (1)$$

где  $Q$  — время, в течение которого спиновая система возвращается к равновесному состоянию,  $t_1$  — период эволюции, на протяжении которого компоненты намагниченности прецессируют с собственными ларморовыми частотами относительно направления постоянного магнитного поля,  $\tau_m$  — период смешивания, в течение которого протекают процессы передачи намагниченности между магнитными ядрами,  $t_2$  — время детектирования сигнала. Для улучшения отношения сигнал/шум и устранения артефактов импульсная последовательность повторяется  $L$  раз с различными фазами радиочастотных импульсов и приемника [6, 8–10]. Двумерную матрицу  $S(t_1, t_2)$  получают путем повторения эксперимента при различных эквидистантных значениях  $t_1$ . Обычно эта матрица содержит от 1024 до 4096 точек в направлении  $t_2$  и от 256 до 512 точек в направлении  $t_1$ . После умножения такой матрицы на фильтрующие функции, дополнения нулями и двумерного фурье-преобразования получают матрицу  $S(\omega_1, \omega_2)$ , называемую NOESY-спектром. На рис. 1 приведено схематическое изображение NOESY-спектра двух близких магнитных ядер, которым отвечают сигналы различной мультиплетности. Широкое распространение в практике получили два типа NOESY-спектров: с сигналами в виде смешанной формы линии и фазоизбирательные спектры поглощения (см., например, [1]). Они различаются методикой получения и обработки матрицы  $S(t_1, t_2)$ . Преимуществом фазоизбирательных спектров является более высокая разрешающая способность.

Факторы, влияющие на объем кросс-пика в NOESY-спектре, условно разделим на две группы. К первой группе отнесем факторы, обусловленные методикой и параметрами эксперимента, нестабильностью работы спектрометра и способом обработки результатов. Во вторую группу входят факторы, обусловленные свойствами исследуемой системы ядерных спинов.

## ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ НА ОБЪЕМЫ КРОСС-ПИКОВ

*Временной интервал*  $Q$ . Этот интервал включают в импульсные последовательности ЯМР-спектроскопии с тем, чтобы спиновая система успела вернуться в равновесное состояние. Для этого время  $t_2+Q$  должно быть не менее чем  $5T_1$ , где  $T_1$  — время продольной релаксации ядерной намагниченности. На практике для получения за приемлемое общее время эксперимента двумерных спектров с хорошим отношением сигнал/шум приходится пользоваться более короткими значениями  $Q$ . В результате спиновая система не успевает полностью вернуться в равновесное состояние. Интенсивность кросс-пиков при этом понижается. Кроме того, объемы кросс-пиков, лежащих по разные стороны от диагонали NOESY-спектра, становятся неодинаковыми. Учесть влияние укороченного времени  $Q$  можно умножением измеренного объема кросс-пика на выражение

$$1/[1-\exp(-(t_2+Q)/T_1)], \quad (2)$$

где  $T_1$  — время неселективной продольной релаксации ядра, обусловившего данный кросс-пик и имеющего химический сдвиг, совпадающий с его координатой  $\omega_1$  ( $Q$  непосредственно предшествует периоду времени  $t_1$ , и, следовательно, неравновесная намагниченность модулируется частотой  $\omega_1$ ). Определить  $T_1$  в данном случае можно методом «насыщение-восстановление» (SR) [11] или «инверсия-восстановление» (IR) [12]. Выражение (2) записано в предположении, что применяется фазовый цикл радиочастотного поля [9, 10], который обеспечивает отсутствие в спиновой системе (в среднем за фазовый цикл) компонент намагниченности, направленных вдоль постоянного магнитного поля, после третьего 90-градусного импульса в последовательности (1). Следует отметить, что в реальном случае для макромолекул ( $T_1 \approx 1,5$ ,  $Q \approx 1$ ,  $t_2 \leq 0,5$  с) поправка достигает 30%. Асимметрия спектра относительно диагонали может быть также связана с различной мультиплетностью сигналов и неодинаковым цифровым разрешением в направлениях  $\omega_1$  и  $\omega_2$ .

Покажем, что при ограниченном времени 2D ЯМР-эксперимента и известных временах продольной релаксации существует оптимальное значение  $Q$  с точки зрения отношения сигнал/шум. Из выражения (2) следует, что отношение сигнал/шум ( $S/N$ ) в двумерном спектре пропорционально

$$S/N \sim [1-\exp(-(t_2+Q)/T_1)] \sqrt{L}. \quad (3)$$

Если на эксперимент при одном фиксированном значении  $t_1$  отведено общее время  $t_3$ , то

$$L = [t_3/(t_n+t_2+Q)] - M, \quad (4)$$

где  $t_n$  — длительность периода времени от первого до последнего импульса последовательности,  $M$  — число повторений импульсной последовательности в начале опыта для приведения спиновой системы в стационарное состояние, не учитываемых при накоплении полезного сигнала. Подставив уравнение (4) в (3) и найдя производную по  $Q$ , получим условие оптимальности:

$$\exp(\Delta) = 1 + 2A(t_n/T_1 + \Delta), \quad (5)$$

где  $\Delta = (t_2+Q)/T_1$ ,  $A = 1 - M(t_n+t_2+Q)/t_3$  — доля экспериментального времени, потраченная на накопление сигнала (обычно  $A \approx 1$ ). Решив уравнение (5) относительно  $Q$ , можно найти наиболее выгодное соотношение временных параметров эксперимента.

В случае  $A \approx 1$  отношение сигнал/шум пропорционально  $K$  (см. (3, 4)):

$$S/N \sim K = [1 - \exp(-\Delta)] / \sqrt{t_n/T_1 + \Delta}.$$

На рис. 2 приведена зависимость величины  $K$  (а следовательно, и отношения  $S/N$ ) от величины  $\Delta$  при  $t_n = 0,2T_1$ . Видно, что при значениях  $t_2+Q$  меньше  $0,6T_1$  или больше  $3,5T_1$  возможна существенная потеря чувствительности в двумерном спектре. В диапазоне значений  $t_2+Q$  от  $0,7T_1$

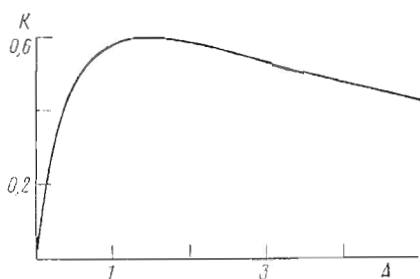


Рис. 2. Зависимость величины  $K$ , определяющей отношения сигнал/шум в двумерном спектре ЯМР, от  $\Delta = (t_2 + Q)/T_1$ . При расчете использовали значение  $t_H/T_1 = 0,2$

до  $2,5T_1$  чувствительность близка к оптимальной. При выборе значения  $Q$  для молекул с заметной дисперсией времен продольной релаксации следует в первую очередь стремиться удовлетворить условию оптимальности (5) для медленно релаксирующих ядер.

*Времена  $t_1$  и  $t_2$ , дополнение матрицы нулями и цифровая фильтрация.* Максимальные значения  $t_1$  и  $t_2$  ограничены как временем эксперимента, так и необходимостью иметь спектр с удовлетворительным отношением сигнал/шум. Оптимальные значения этих параметров определяются также временами поперечной релаксации и необходимым разрешением [13]. Малое число точек в направлениях  $t_1$  и  $t_2$  приводит к низкому цифровому разрешению, появлению осциллирующих искажений в спектрах (особенно вдоль оси  $\omega_1$ ) и, как следствие, к увеличению погрешности измерения объемов кросс-пиков.

Дополнение матрицы нулями перед фурье-преобразованием позволяет улучшить цифровое разрешение, но более чем четырехкратное дополнение не приводит к дальнейшему улучшению [14, 15].

Цифровая фильтрация спектров используется для повышения отношения сигнал/шум и улучшения разрешения. При ее применении к спектрам, предназначенным для измерения объемов кросс-пиков, необходимо соблюдать осторожность. Функции, на которые производят домножение матрицы перед преобразованием Фурье, не должны менять соотношение объемов кросс-пиков. В работе [16] исследовано влияние цифровой фильтрации на площадь сигналов в одномерных спектрах и сделан вывод о предпочтительном использовании гауссовой аподизации. Анализ влияния цифровой фильтрации на объемы кросс-пиков в двумерных спектрах ЯМР заслуживает специального исследования.

*Время  $\tau_m$ .* Значение  $\tau_m$  оказывает самое существенное влияние на интенсивность кросс-пиков и, следовательно, на отношение сигнал/шум. Мы не будем останавливаться здесь на обсуждении этого параметра, так как выбор оптимального значения  $\tau_m$  обусловлен главным образом свойствами исследуемой системы и будет рассмотрен в дальнейшем. Укажем лишь, что при исследовании макромолекул, времена корреляции для которых находятся в пределах 2–15 нс, обычно  $\tau_m$  устанавливают в диапазоне 50–200 мс.

*Шумы и искажения спектра.* Стохастический шум, систематические  $t_1$ - и  $t_2$ -шумы [17–19] и искажения базовой плоскости в спектрах приводят к погрешностям при измерении объемов кросс-пиков.

Наличие в спектрах стохастического шума связано с конечной чувствительностью спектрометра. Ослабить влияние этого фактора можно, используя приборы с высокой напряженностью постоянного магнитного поля, совершенствуя конструкцию датчика, передающей и приемной части спектрометра, увеличивая динамический диапазон регистрирующего цифрового устройства, повышая концентрацию исследуемого вещества и увеличивая число накоплений. Следует, однако, отметить, что увеличение числа накоплений ведет к удлинению эксперимента, в результате чего на качество спектра все большее влияние оказывают нестабильности работы спектрометра (связанные, в частности, с непостоянством внешних условий в лаборатории) и нестабильность исследуемой системы. На практике время проведения 2D-эксперимента обычно ограничивают 2–3 сут. Повысить отношение сигнал/шум в спектре можно, укорачивая времена

$t_1$  и  $t_2$  (оптимальные времена выбирают, исходя из времен поперечной релаксации ядер [13]).

$t_1$ - и  $t_2$ -Шумом называются паразитные полосы в спектре, совпадающие с частотами высокоинтенсивных сигналов и параллельные осям  $\omega_1$  и  $\omega_2$  соответственно. Причины появления  $t_1$ - и  $t_2$ -шумов были проанализированы в работах [17–19]. Показано [17–21], что шумы можно ослабить, применяя специальные методики накопления и обработки спектров.

Присутствие в спектре интенсивного сигнала (например, сигнала от растворителя) и неточное фазирование спектра приводят к искажению базовой плоскости спектра, особенно вблизи диагонали. Поэтому перед вычислением объемов кросс-пиков необходимо проводить коррекцию базовой плоскости 2D-спектра [22].

Вклад перечисленных выше факторов практически можно оценить, проинтегрировав свободный от сигналов участок спектра, непосредственно прилегающий к данному кросс-пику и равный по площади области интегрирования объема этого кросс-пика.

*Спин-спиновое взаимодействие.* Вследствие скалярного спин-спинового взаимодействия ядер в 2D NOESY-спектрах появляются дополнительные сигналы, которые получили название « $J$ -кросс-пики» [8]. При исследовании макромолекул вклад  $J$ -кросс-пиков в NOESY-спектр особенно существен при коротких ( $\leq 100$  мс) временах  $\tau_m$ . При этом наибольший вклад в амплитуду  $J$ -кросс-пики в NOESY-спектре обусловлен поляризацией когерентностью ядер [8].  $J$ -кросс-пики можно существенно ослабить либо совсем устранить путем цифровой фильтрации, случайной вариацией длительности периода  $\tau_m$  или применением расфокусирующего 180-градусного импульса в период  $\tau_m$  [8]. В фазоизбирательных 2D NOESY-спектрах поглощения компоненты  $J$ -кросс-пиков имеют противоположные фазы и, следовательно, их интегральная интенсивность в пределах мультиплетного пика равна нулю [8].

*Перекрытие кросс-пиков.* Одним из самых трудноучитываемых факторов при определении объемов кросс-пиков является их перекрытие. В этом случае можно проинтегрировать ту часть кросс-пики, которая не перекрывается с другими сигналами, а затем, используя его симметрию, домножить результат на соответствующий коэффициент. Другим способом решения этой проблемы является разложение перекрытых кросс-пиков на их линейную комбинацию при условии, что известны формы линий [23]. Следует отметить, что для обоих способов интегрирования перекрывающихся кросс-пиков необходимо обращать внимание на возможное присутствие  $J$ -кросс-пиков, которые искажают форму и амплитуду кросс-пиков ЯЭО.

Соотношение вкладов, обусловленных перечисленными выше факторами, зависит от большого числа параметров (концентрации вещества, стабильности условий и т. д.). Поэтому количественно оценивать их влияние нужно в каждом конкретном случае.

### ВЛИЯНИЕ СВОЙСТВ ИССЛЕДУЕМОЙ СИСТЕМЫ НА ПОГРЕШНОСТИ МАТЕМАТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ОБЪЕМОВ КРОСС-ПИКОВ

*Выбор модельной системы.* Свойства исследуемой системы сугубо индивидуальны. Поэтому следует искать закономерности, присущие системам определенного класса. Для поиска закономерностей, собственных полипептидам, мы исследовали влияние на объемы кросс-пиков ЯЭО в NOESY-спектрах времени смешивания  $\tau_m$ , наличия большого количества взаимодействующих протонов в молекуле, времени корреляции  $\tau_c$  и времен продольной релаксации ядер. Мы остановили свой выбор на ранее исследованной структуре — правой  $\pi_{L,D}^{76,3^*} \pi_{L,D}^{6,3}$ -спирали грамицидина А в мицеллах додецилсульфата натрия [24, 25]. Из-за того, что боковые цепи всех аминокислотных остатков этого  $L,D$ -полипептида расположены на поверхности спирали, получается плотная упаковка боковых цепей. Система грамицидина А — мицелла додецилсульфата натрия имеет молекуляр-

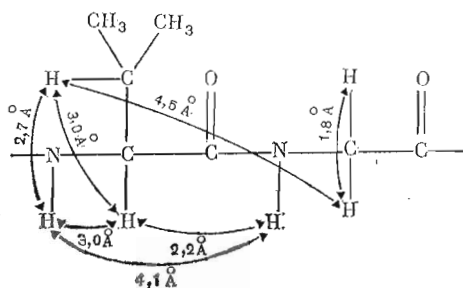


Рис. 3. Дипептидный фрагмент -Val<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>-грамицидина А, выбранный для демонстрации влияния свойств исследуемой системы на объемы кросс-пиков ЯЭО. Указаны расстояния между протонами, обуславливающими рассматриваемые в тексте кросс-пики

ную массу  $\approx 25$  КДа, т. е. находится на пределе имеющихся в настоящее время возможностей исследования детальной пространственной структуры полипептидов методом ЯМР-спектроскопии высокого разрешения. С другой стороны, относительно небольшая масса самого димера грамицидина А ( $\approx 4$  КДа) делает его удобным объектом для моделирования эксперимента с помощью расчетных методов. Таким образом,  $\rightarrow 6,3 \leftarrow \text{PLD} \text{PLD} \leftarrow 6,3$ -димер грамицидина А позволяет теоретически проанализировать факторы, наиболее существенные при интерпретации объемов кросс-пиков ЯЭО в NOESY-спектрах.

Влияние свойств исследуемой системы было проанализировано для ряда кросс-пиков между протонами грамицидина А. Обсуждение результатов мы проводим на примере кросс-пиков между протонами дипептидного фрагмента Val<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup> грамицидина А (см. рис. 3).

*Математическая модель системы.* Показано [26], что эффекты кросс-корреляции в процессах межпротонной релаксации не оказывают существенного влияния на NOESY-спектр. Поэтому объемы сигналов в NOESY-спектрах моделировали в соответствии с выражением [7, 27, 28]:

$$V(\tau_m) = \exp(-R\tau_m)V^0 = D \exp(-\Lambda\tau_m)D^{-1}V^0, \quad (6)$$

где  $V(\tau_m)$  — матрица объемов сигналов;  $R$  — матрица скоростей продольной релаксации;  $\Lambda$  — диагональная матрица, содержащая собственные значения матрицы  $R$ ;  $D$  — матрица собственных векторов матрицы  $R$ ;  $V^0$  — матрица объемов сигналов, соответствующая моменту времени  $\tau_m = 0$ . Матрица  $V^0$  является диагональной, ее элементы непосредственно связаны с состоянием спиновой системы перед первым 90-градусным импульсом. Выше уже указывалось, что при недостаточной длительности периода  $Q$  исходное состояние может быть неравновесным, и тогда диагональные элементы матрицы  $V^0$  не равны между собой, и, следовательно, матрица  $V(\tau_m)$  несимметрична. В наших расчетах мы пренебрегли этим фактором, т. е. приняли  $V^0$  единичной матрицей. Следует также отметить, что в реальном случае действительной и симметричной матрицы  $R$  матрица  $D^{-1}$  совпадает с транспонированной  $D$  (см., например, [28]), что существенно упрощает расчеты.

Использование алгоритмов, основанных на разложении формулы (6) по степеням матрицы  $R$ , ограничено короткими временами  $\tau_m$ . Поэтому предпочтительно использовать формализм, основанный на диагонализации матрицы  $R$ . Однако расчет объемов кросс-пиков по формуле (6) из полной релаксационной матрицы макромолекулы требует больших затрат времени, так как время, необходимое для нахождения собственных значений и собственных векторов матрицы релаксации и последующей редиагонализации, увеличивается с ростом размерности матрицы приблизительно по кубической зависимости. Поэтому для расчетов объемов кросс-пиков мы использовали усеченные матрицы релаксации, учитывающие взаимодействие с 50–70 ближайшими протонами. Дальнейшее увеличение размера усеченной матрицы не приводит к существенным изменениям объемов кросс-пиков, но вызывает резкое увеличение времени счета.



Матрица релаксации  $R$  системы, состоящей из  $n$  ядер, имеет вид

$$R = \begin{vmatrix} \rho_1 & \sigma_{12} & \cdot & \cdot & \sigma_{1n} \\ \sigma_{21} & \rho_2 & \cdot & \cdot & \sigma_{2n} \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \sigma_{n1} & \cdot & \cdot & \cdot & \rho_n \end{vmatrix},$$

где элементы  $\sigma_{ij}$  — скорости кросс-релаксации между  $i$ -м и  $j$ -м ядрами, а  $\rho_i$  характеризует скорость перехода намагниченности с  $i$ -го ядра на другие ядра молекулы и в окружающую систему. В интересующем нас случае протонов основной цепи макромолекул выполняется условие медленного движения ( $\omega_0 \gg \tau_c^{-1}$ , где  $\omega_0$  — рабочая частота спектрометра) и поэтому релаксация определяется вероятностью ноль-квантового перехода [8]. Тогда диагональные элементы матрицы релаксации имеют вид

$$\rho_i = 1/T_{1i} - \sum_{j \neq i} \sigma_{ij}, \quad (7)$$

где  $T_{1i}$  — время неселективной продольной релаксации соответствующего протона. Скорости кросс-релаксации между метильными протонами рассчитывали по формуле [29]:

$$\sigma_{ij} = -\gamma^4 \hbar^2 \tau_c / 10 r_{ij}^6, \quad (8)$$

где  $\gamma$  — гиромагнитное соотношение для протонов,  $\hbar$  — постоянная Планка и  $r_{ij}$  — расстояние между соответствующими протонами. Время корреляции  $\tau_c$  принимали одинаковым для всех пар протонов молекулы, что справедливо для жестких, изотропно вращающихся молекул. Очевидно, при наличии локальной подвижности или анизотропии вращения молекулы  $\tau_c$  должно быть индивидуальным для различных частей молекулы или даже для каждой пары протонов. Для расчета скоростей кросс-релаксации с участием метильных протонов воспользовались моделью быстрых случайных скачков между дискретными состояниями метильной группы в медленно и изотропно вращающейся молекуле [30]. Предположение об изотропности вращения справедливо для рассматриваемой системы, так как мицелла имеет сферическую форму. Это предположение справедливо и для глобулярных белков, также имеющих форму, близкую к сферической.

*Представление результатов.* Используемое обычно (см., например, [7]) представление зависимости объема кросс-пика от  $\tau_m$  неудобно для анализа влияния различных факторов на объем кросс-пика ЯЭО. Поэтому в дополнение к традиционной мы остановились на следующей форме представления результатов. В качестве эталонной функции  $V_{ref}(\tau_m)$  выбирается зависимость объема одного из кросс-пиков от  $\tau_m$ . Все остальные зависимости  $V(\tau_m)$ , которые подлежат сравнительному анализу, преобразуются к виду

$$f(\tau_m) = \log_2 [V(\tau_m)/V_{ref}(\tau_m)].$$

Логарифм обеспечивает одинаковую чувствительность к относительному повышению и понижению объема кросс-пиков. Выбор основания логарифма произволен и не сказывается на анализе результатов.

*Влияние времени продольной релаксации.* Поскольку из-за перекрытия сигналов не удастся измерить времена  $T_1$  для всех протонов макромолекулы, для расчета диагональных элементов матрицы релаксации (7) мы использовали экспериментально определенные методом «инверсия-восстановление» [12] для грамицидина А в мицеллах додецилсульфата натрия времена продольной релаксации, характерные для различных типов протонов (0,9 с для NH, 0,7 с для C<sup>2</sup>H, 0,5–0,6 с для C<sup>β</sup>H, C<sup>γ</sup>H и C<sup>δ</sup>H-протонов и т. д.). Различие во временах спин-решеточной релаксации однотипных протонов в жесткой макромолекуле в отсутствие парамагнитных веществ не превышает 30–40% (см., например, [31]).

Методом *IR-COSY* [31] может быть получена более детальная информация о временах продольной релаксации, но, как будет показано ниже, в этом нет необходимости.

Прежде всего представляет интерес, какое влияние оказывают ошибки измерения  $T_1$  на результаты моделирования NOESY-спектров и изменения времен  $T_1$  (вызванные, например, присутствием парамагнитных ионов) на объемы кросс-пиков в экспериментально полученных NOESY-спектрах. Очевидно, что это влияние зависит от соотношения величин  $1/T_{1i}$  и  $\sum_j \sigma_{ij}$  (см. уравнение (7)). В рассматриваемом нами диапазоне значений  $\tau_c$  (от 1 до 15 нс) с увеличением времени  $\tau_c$  вклад скорости неселективной релаксации ( $1/T_{1i}$ ) в диагональные элементы ( $\rho_i$ ) матрицы релаксации резко уменьшается (см., например, [32–34]), следовательно, уменьшается и влияние  $T_1$ . Поэтому мы ограничились моделированием влияния спин-решеточной релаксации при  $\tau_c=1$  нс. В этом случае отношение величин  $1/T_{1i}$  и  $\sum_j \sigma_{ij}$  для метильных протонов грамицидина А, полученное из рассчитанной матрицы релаксации, имело значение, близкое к 1:1 (что характерно для молекул с  $\tau_c \approx 1$  нс [32]).

На рис. 4 показано влияние изменения времени  $T_1$  одного из протонов на объемы кросс-пиков ЯЭО с участием данного протона и объемы кросс-пиков ЯЭО между соседними с ним протонами. Кривые 2 и 3 получены при изменении  $T_1$  на 20%, что близко к точности измерения  $T_1$ . Кривые 1 и 4 получены в результате изменения скорости неселективной продольной релаксации в 2 раза (такая ошибка может возникнуть, например, когда значения  $T_1$  для отдельных протонов не измерены и задаются в соответствии с данными об однотипных протонах). Характерные результаты, приведенные на рис. 4а, свидетельствуют, что изменение времени продольной релаксации одного из протонов (даже в 2 раза) приводит к небольшому ( $\sim 15\%$  при  $\tau_m \leq 200$  мс) изменению объема кросс-пика. Такая ошибка находится в пределах экспериментальной погрешности измерения объемов кросс-пиков в двумерных спектрах. На объеме кросс-пика между двумя протонами изменение времени продольной релаксации третьего протона сказывается очень слабо ( $\sim 3\%$  при  $\tau_m \leq 200$  мс (см. рис. 4б)). Если протоны, обуславливающие кросс-пик, сближены (расстояние  $\leq 3$  Å), влияние изменения времени релаксации третьего протона становится во много раз слабее, чем на рис. 4б. Как уже указывалось, с увеличением  $\tau_c$  влияние  $T_1$  на объемы кросс-пиков будет еще слабее. Таким образом, для моделирования объемов кросс-пиков ЯЭО в NOESY-спектрах макромолекул нет необходимости измерять времена  $T_1$  всех протонов и можно ограничиться характерными для однотипных протонов значениями. Тем не менее всегда надо помнить об обусловленных коротким периодом  $Q$  искажениях объемов кросс-пиков и вводить соответствующую поправку на выражение (2) при сравнении экспериментальных и расчетных объемов кросс-пиков.

*Зависимость объема кросс-пика в NOESY-спектрах от  $\tau_c$ .* Время корреляции  $\tau_c$  является одним из параметров, необходимых при математическом моделировании объемов кросс-пиков ЯЭО. Получить полные и точные данные о временах корреляции межпротонных векторов молекулы очень трудно, в настоящее время практически невозможно. Поэтому мы анализировали, как влияет выбор значения  $\tau_c$  на результаты модельных расчетов. На рис. 5 представлены результаты расчетов объемов кросс-пиков для двух протонов, находящихся на различных расстояниях (1,8; 2,2; 3,0 и 4,1 Å) при нескольких значениях  $\tau_c$  (1, 2, 4, 8 и 15 нс).

Для каждой пары протонов в зависимости от расстояния между ними и времени корреляции  $\tau_c$  существует оптимальное с точки зрения чувствительности значение  $\tau_m$ , при котором интенсивность данного кросс-пика максимальна. Для сближенных протонов значение  $\tau_m$  меньше, чем для удаленных. Широко используемый в практике диапазон значений  $\tau_m$  между 50 и 200 мс соответствует оптимальной чувствительности для кросс-пиков между протонами NH, C<sup>n</sup>N и C<sup>β</sup>N дипептидного фрагмента полипептида в широком интервале времен корреляции  $\tau_c$ : 2–15 нс (см. рис. 5а–г).

При очень коротких временах  $\tau_m$  объем кросс-пика пропорционален



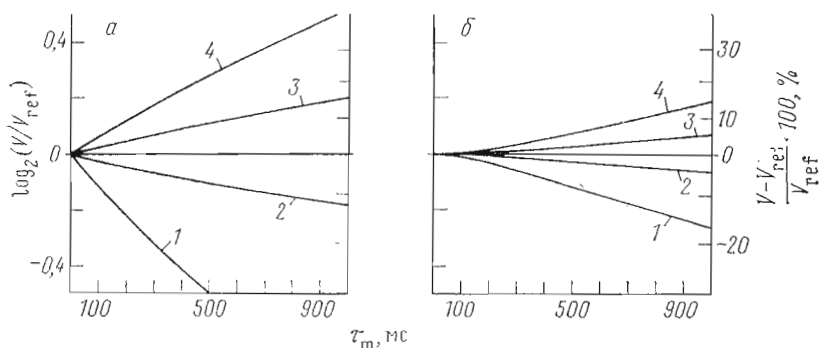


Рис. 4. Влияние изменения времен продольной релаксации протонов на  $\log_2(V/V_{ref})$  для кросс-пиков ЯЭО: *a* —  $C^{\alpha}H/C^{\beta}H$  Val<sup>1</sup> при изменении  $T_1$  протона  $C^{\alpha}H$  Val<sup>1</sup>; *b* —  $NH$  Val<sup>1</sup>/ $NH$  Gly<sup>2</sup> при изменении  $T_1$  протона  $C^{\alpha}H$  Val<sup>1</sup>. Расстояния между указанными протонами приведены на рис. 3. В качестве эталонной ( $V_{ref}$ ) выбраны зависимости, рассчитанные для соответствующих пар протонов по уравнению (6) с использованием экспериментально найденных для грамицидина А времен продольной релаксации (см. «Экспериментальную часть»). Для расчета зависимостей, обозначенных на рисунке цифрами, использовали времена продольной релаксации протонов: 1 — в 2 раза заниженные; 2 — на 20% заниженные; 3 — на 20% завышенные; 4 — в 2 раза завышенные относительно экспериментально измеренных

скорости прямой передачи намагниченности между ядрами (уравнение (8)) и, следовательно, линейно зависит от  $\tau_c$  и  $r^{-6}$ . С увеличением  $\tau_m$  начинает сказываться влияние окружающих протонов и зависимость объема кросс-пика от  $\tau_c$  усложняется. Кроме того, с увеличением  $\tau_m$  меняется соотношение объемов кросс-пиков, рассчитанных для различных значений  $\tau_c$  (рис. 5*б-з*). Следовательно, использование объемов кросс-пиков ЯЭО, полученных только при одном значении  $\tau_m$ , для оценки расстояний внутримолекулярной подвижности требует особой осторожности. Так, если в молекуле есть несколько пар протонов, расстояние между которыми фиксировано и одинаково (например, геминальные протоны или протоны ароматических колец), совпадение объемов соответствующих кросс-пиков не является достаточным основанием для утверждения об их одинаковой подвижности. Например, две пары геминальных протонов, имеющие времена корреляции 8 и 15 нс, будут давать одинаковые по объему кросс-пики при  $\tau_m=40$  мс (см. пересечение кривых 4 и 5 на рис. 5*а* и *д*). По той же причине, если один из таких кросс-пиков больше, чем другой, даже при нескольких значениях  $\tau_m$ , нельзя без привлечения дополнительной информации указать пару протонов, подвижность которой выше.

Полученные результаты показывают, что при проведении расчетов объемов кросс-пиков в NOESY-спектрах неопределенность значения  $\tau_c$  может приводить к заметным искажениям объемов сигналов. Эти искажения особенно велики при коротких  $\tau_m$ . С ростом  $\tau_m$  относительная ошибка в значении объема уменьшается, а затем меняет знак (см. рис. 5*б-з*). Используя оценочные значения  $\tau_c$  и зависимости, аналогичные приведенным на рис. 5, можно выбрать такое значение  $\tau_m$ , при котором влияние ошибки в величине  $\tau_c$  на объем кросс-пика будет минимальным. Не следует, однако, использовать слишком большие  $\tau_m$ , так как они не обеспечивают оптимальной чувствительности. Кроме того, с увеличением  $\tau_m$  происходит потеря информации о пространственной организации молекулы. Это обусловлено процессами переноса намагниченности и проявляется во все меньшем соответствии между объемами кросс-пиков (см. рис. 6) и расстояниями между протонами. На рис. 6 показано, что с увеличением  $\tau_c$  потеря информации происходит при более коротких  $\tau_m$ .

**Влияние окружения.** Поскольку NOESY-эксперимент практически всегда имеет своей целью установление неизвестной пространственной структуры, учет влияния всех ядер молекулы, расположение которых заранее неизвестно, оказывается весьма сложной задачей. Решение ее можно искать путем итерационного согласования пространственной структуры и рассчитанной из нее матрицы объемов кросс-пиков со спектром NOESY.

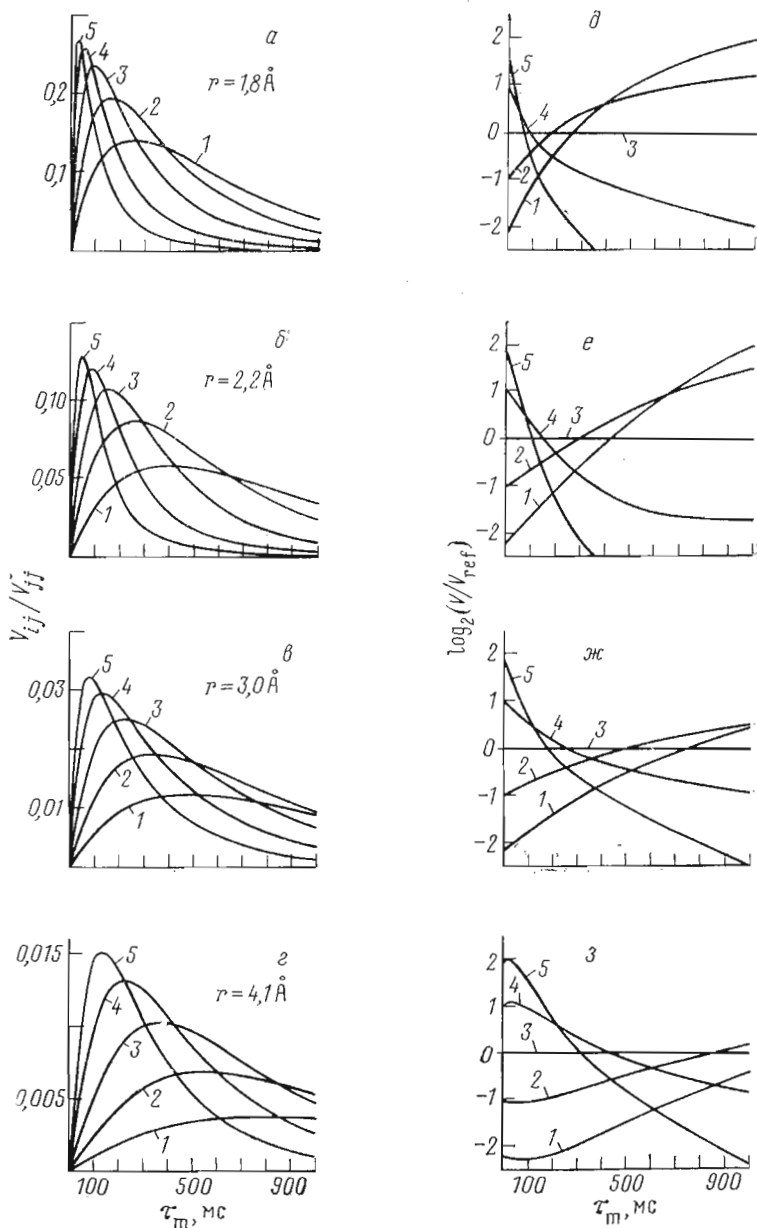


Рис. 5. Влияние времени корреляции  $\tau_c$  на зависимость объемов кросс-пиков ЯЭО\* (а-г) и на  $\log_2(V/V_{ref})$  (б-г) от  $\tau_m$  (в качестве  $V_{ref}$  выбран объем соответствующего кросс-пика при  $\tau_c=4$  нс). Рассматриваются кросс-пики между геминальными протонами группы  $C^\alpha H_2 Gly^2$  (а, б),  $C^\alpha H Val^1/NH Gly^2$  (б, в),  $NH/C^\alpha H Val^1$  (в, ж),  $NH Val^1/NH Gly^2$  (г, з). Расстояния между указанными протонами приведены на рисунке. Кривые 1-5 получены для времен  $\tau_c=1, 2, 4, 8$  и 15 нс соответственно

Для больших молекул эта процедура требует больших затрат компьютерного времени, не говоря уже о свойственных оптимизационным задачам проблемах. Другой подход, предложенный для решения этой задачи, основан на расчете матрицы релаксации из матрицы объемов пиков в NOESY-спектре [28, 35, 36]. Этот метод имеет свои недостатки, обусловленные перекрыванием кросс-пиков и проблемами интегрирования диагональных пиков в NOESY-спектрах сложных молекул.

Принципиально иная возможность связана с иерархическим алгоритмом реконструкции пространственной структуры по данным спектроскопии ЯМР. При этом (см., например, [37, 38]) сначала определяется локальная структура (приближенные значения углов  $\phi$ ,  $\psi$  и  $\chi$  аминокислотных остат-

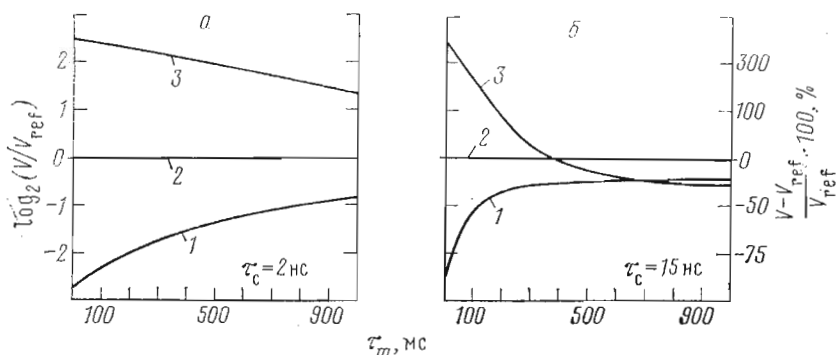


Рис. 6. Зависимость отношений объемов различных кросс-пиков ЯЭО от времени  $\tau_m$  при различных  $\tau_c$ : 2 (а) и 15 нс (б). В качестве  $V_{ref}$  выбрана зависимость для кросс-пика между протонами  $NH/C^\alpha H Val^1$ . Номера обозначены зависимости для кросс-пиков между протонами: 1 —  $NH Val^1/NH Gly^2$ ,  $r=4,1 \text{ \AA}$ , 2 —  $NH/C^\alpha H Val^1$ ,  $r=3,0 \text{ \AA}$ , 3 —  $C^\alpha H Val^1/NH Gly^2$ ,  $r=2,2 \text{ \AA}$

ков), затем выделяются участки вторичной структуры ( $\alpha$ -спирали,  $\beta$ -структуры,  $\beta$ -изгибы и т. д.) и, наконец, из элементов вторичной структуры строится модель пространственной структуры белка. Очевидно, что анализ локальной структуры на основе объемов кросс-пиков будет правомерен, если можно пренебречь влиянием ряда протонов, окружающих рассматриваемый фрагмент.

Наиболее интересными для определения локальной структуры полипептидов являются кросс-пики ЯЭО между протонами, принадлежащими одному и тому же аминокислотному остатку ( $NH$ ,  $C^\alpha H$ ,  $C^\beta H$ ), и между этими протонами и протоном  $NH$  следующего в полипептидной цепи остатка. Расстояния между этими атомами связаны известными соотношениями [39] с торсионными углами  $\phi$ ,  $\psi$  и  $\chi^1$ . Рассмотрим, как окружающие ядра влияют на объемы кросс-пиков между этими протонами.

Объемы кросс-пиков в NOESY-спектрах самым существенным образом зависят от конформации молекулы. Например, объем  $V_{ij}$  кросс-пика ЯЭО с координатами  $\Omega_i$ ,  $\Omega_j$  (рис. 1) определяется не только расстоянием  $r_{ij}$  между  $i$ -м и  $j$ -м ядрами и временем корреляции вектора  $\vec{r}_{ij}$ , но и влиянием окружающих ядер. Для того чтобы проиллюстрировать основные тенденции влияния окружения, ограничимся квадратичным разложением формулы (6) в ряд по степеням матрицы  $R$  при коротких временах  $\tau_m$ . При этом объем кросс-пика, отвечающего  $i$ -му и  $j$ -му ядрам, можно записать как

$$V_{ij}(\tau_m) \approx \left\{ -\sigma_{ij}\tau_m + \left[ \sigma_{ij}(\rho_i + \rho_j) + \sum_{k \neq i, j} \sigma_{ik}\sigma_{kj} \right] \tau_m^2/2 \right\} V_{ij}^0. \quad (9)$$

Подставив выражение (7), получаем, что влияние окружающих протонов молекулы описывается выражением

$$\left\{ \left[ -\sigma_{ij} \left( \sum_{k \neq i} \sigma_{ik} + \sum_{k \neq j} \sigma_{jk} \right) + \sum_{k \neq i, j} \sigma_{ik}\sigma_{kj} \right] \tau_m^2/2 \right\} V_{ij}^0. \quad (10)$$

Выражение (10) записано в предположении, что  $\omega_0 \gg \tau_c^{-1}$ . В этом случае все релаксационные параметры  $\sigma$  имеют один и тот же (отрицательный) знак. С учетом этого видно, что влияние окружения имеет две противоположные тенденции (описываемые двумя слагаемыми, стоящими в квадратных скобках). Во-первых, окружающие ядра вызывают уменьшение намагниченности  $i$ -го и  $j$ -го ядер и поэтому объем кросс-пика ( $V_{ij}$ ) уменьшается (в квадратичном приближении это отражается первым слагаемым в выражении (10)). В дальнейшем этот вклад называется «переходом намагниченности» на окружающие ядра. Во-вторых, происходит увеличение передачи намагниченности между  $i$ -м и  $j$ -м ядрами из-за наличия всевозможных многостадийных путей передачи через окружающие магнитные

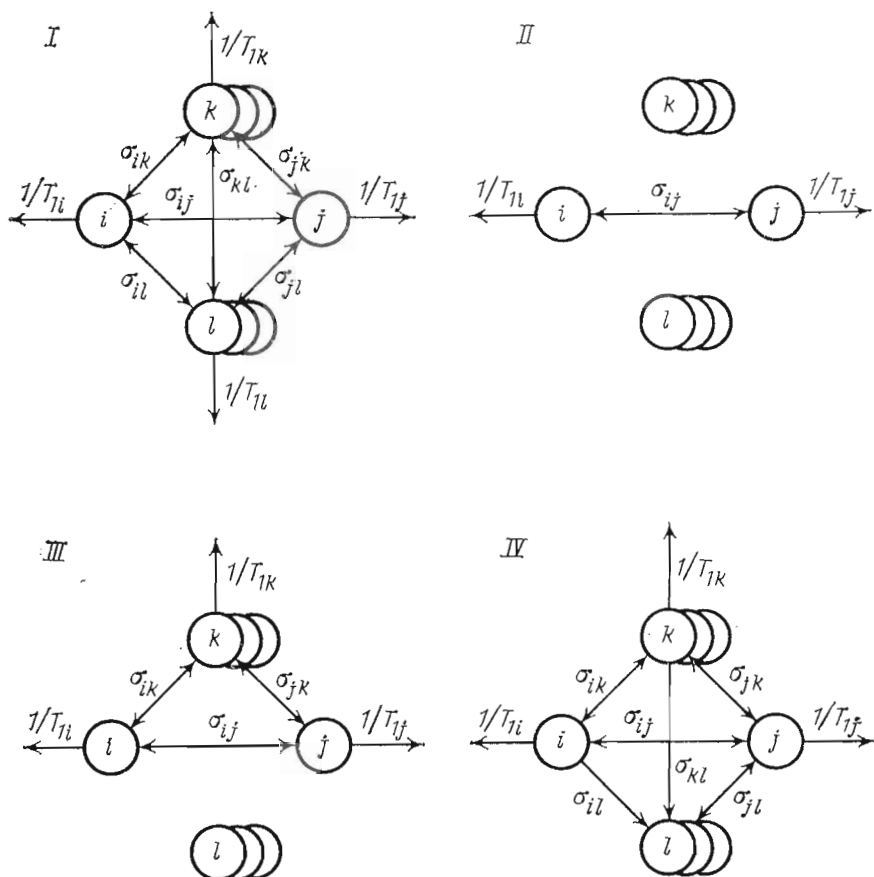


Рис. 7. Схематическое изображение путей передачи намагниченности, учтывавшихся при расчете кривых I–IV на рис. 8 и 9. Индексами  $i$  и  $j$  обозначены обуславливающие кросс-пик протоны,  $k$  – другие протоны дипептидного фрагмента,  $l$  – остальные протоны молекулы;  $\sigma$  – скорость кросс-релаксации,  $T_i$  – время неселективной продольной релаксации. В модели IV учтены все возможные пути «перехода намагниченности» с протонов дипептидного фрагмента

ядра (в квадратичном приближении этот эффект описывается вторым слагаемым в квадратных скобках выражения (10)). Этот процесс известен как «спиновая диффузия» [7, 28, 29].

Для анализа различных вкладов влияния окружения на объемы кросс-пиков, а также для исследования возможностей использования упрощенных математических моделей при определении пространственной структуры полипептидов воспользуемся моделями I–IV (рис. 7), которые с различной степенью полноты описывают взаимодействие с окружающими ядрами. Учтываемые в моделях I–IV пути переноса намагниченности показаны стрелками на рис. 7.

Модель I (рис. 7, I) учитывает взаимодействие между всеми протонами молекулы. Для ее практической реализации необходимо проводить расчеты объемов кросс-пиков в соответствии с выражением (6), используя матрицу релаксации всех протонов молекулы.

Модель II (рис. 7, II) учитывает взаимодействие только между протонами в рассматриваемой паре (с учетом их неселективной продольной релаксации) и не учитывает многоспиновых эффектов.

Модель III (рис. 7, III) рассматривает дипептидный фрагмент изолированно от остальных протонов молекулы. Таким образом, эта модель не учитывает ни «переход намагниченности» на окружающие дипептидный фрагмент протоны молекулы, ни «спиновую диффузию» через эти протоны. Реализация модели III требует использования алгоритма, описанного в разделе «Математическая модель системы», а также координат и времен

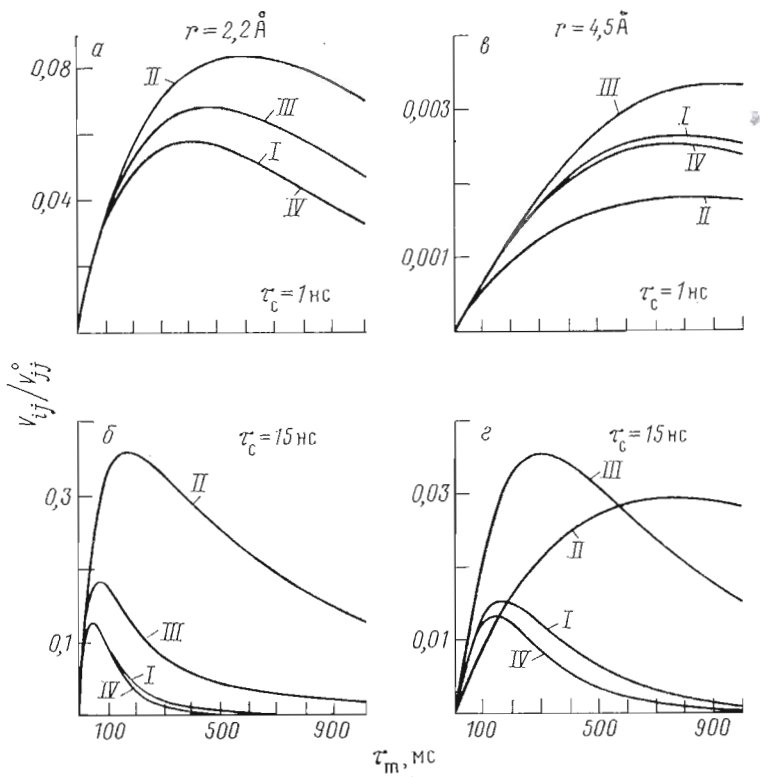


Рис. 8. Зависимости объема кросс-пика ЯЭО от  $\tau_m$  для сближенных ( $C^{\alpha}H\text{Val}^1$  и  $NH\text{Gly}^2$ ,  $r=2,2\text{ \AA}$ ) (а, б) и удаленных ( $C^{\beta}H\text{Val}^1$  и  $NH\text{Gly}^2$ ,  $r=4,5\text{ \AA}$ ) (в, г) протонов при двух значениях  $\tau_c$ : 1 (а, в), 15 нс (б, г). Кривые I–IV соответствуют моделям, схематически изображенным на рис. 7

неселективной спин-решеточной релаксации лишь протонов дипептидного фрагмента.

Модель IV (рис. 7, IV) отличается от модели III тем, что учитывает «переход намагниченности» на окружающие дипептидный фрагмент протоны молекулы. Для ее реализации на практике необходимо знать времена селективной спин-решеточной релаксации протонов дипептидного фрагмента (см. формулу (7)). При расчете объемов кросс-пиков по этой модели мы использовали вместо скоростей селективной спин-решеточной релаксации диагональные элементы матрицы релаксации всей молекулы.

Покажем, какое влияние оказывают окружающие протоны молекулы на объем кросс-пика и как это влияние зависит от расстояния между протонами, обуславливающими кросс-пик. Кривые I и II на рис. 8 и 9 рассчитаны по моделям I и II (рис. 7, I и II). Различие между кривыми I и II иллюстрирует влияние окружения на объем кросс-пиков. Из сравнения этих кривых видно, что при значениях  $\tau_m$ , обеспечивающих максимальное отношение сигнал/шум (50–200 мс), на объем кросс-пика ЯЭО между двумя протонами существенное воздействие оказывают окружающие ядра (см. кривые I и II на рис. 8 и 9). Это значительно ограничивает надежность простой количественной интерпретации NOESY-спектров.

Влияние окружения на кросс-пики между протонами, сближенными на расстояние  $\leq 3\text{ \AA}$ , проявляется в понижении их объема за счет ускорения релаксации. В результате кривые I проходят ниже, чем кривые II на рис. 8а, б и рис. 9а–г. На кросс-пиках между удаленными протонами влияние окружения сказывается иначе. При коротких временах  $\tau_m$  эффект «спиновой диффузии» может превосходить влияние «перехода намагниченности» на окружающие ядра (на рис. 8в, г и рис. 9д, е кривые I проходят выше, чем кривые II), т. е. влияние окружающих ядер повышает объем кросс-пика. Этим, в частности, объясняется различие в поведении зависимостей на рис. 5з и на рис. 5д–ж при коротких временах  $\tau_m$ .



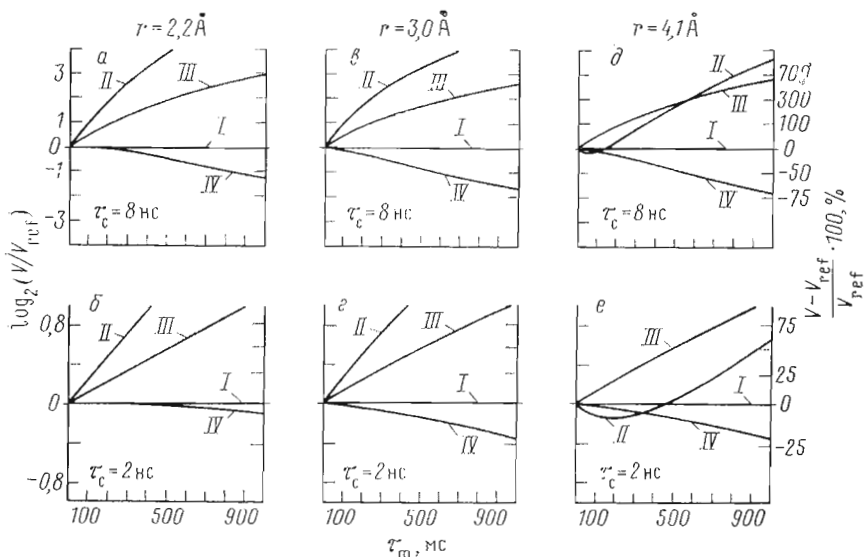


Рис. 9. Зависимости  $\log_2(V/V_{ref})$  от времени  $\tau_m$  для кросс-пиков между протонами  $C^\alpha H Val^1 / NH Gly^2$ ,  $r=2,2 \text{ \AA}$  (а, б),  $NH / C^\alpha H Val^1$ ,  $r=3,0 \text{ \AA}$  (б, е),  $NH Val^1 / NH Gly^2$ ,  $r=4,1 \text{ \AA}$  (в, е) при различных значениях  $\tau_c$ , указанных на рисунке. В качестве  $V_{ref}$  использовались зависимости, учитывающие влияние всех окружающих протонов (кривые I на рис. 8). Обозначение кривых то же, что и на рис. 8

Преобладание вклада «спиновой диффузии» при коротких  $\tau_m$  можно объяснить, проанализировав соотношение вкладов в квадратичном приближении (см. выражение (10)). В самом деле, для удаленных протонов величина  $\sigma_{ij}$  очень мала и велика вероятность того, что вблизи как с  $i$ -м, так и с  $j$ -м протонами найдется некий  $k$ -й протон (или несколько протонов), который обеспечит преобладание «спиновой диффузии» над «переходом намагниченности» на окружающие протоны молекулы. В квадратичном приближении вклад окружения не меняет знак с увеличением  $\tau_m$  (см. уравнение (9)). Однако для удаленных протонов при больших  $\tau_m$  всегда наблюдается преобладание «перехода намагниченности» на окружающие ядра (рис. 9д, е) и кривые I проходят ниже, чем кривые II. Из этого следует, что в точке перегиба кривых II на рис. 9д, е квадратичное приближение уже плохо описывает соотношение двух тенденций влияния окружения, а в точке пересечения кривых I и II дает совершенно неверный результат. Таким образом, область применимости квадратичного приближения ограничена сравнительно коротким  $\tau_m$  (например, значениями  $\tau_m$  менее 100 мс при  $\tau_c=2$  нс и  $r_{ij}>3,5 \text{ \AA}$ ).

При используемых на практике значениях  $\tau_m$  (50–200 мс) для пептидов и белков «переход намагниченности» на окружающие ядра и «спиновая диффузия» не компенсирует друг друга (за исключением отдельных значений  $\tau_m$  для удаленных протонов (см. пересечение кривых I и II на рис. 9д, е)). Поэтому для корректной интерпретации объемов кросс-пиков необходимо учитывать влияние окружения.

Проанализируем влияние протонов, принадлежащих дипептидному фрагменту (обозначенных индексом  $k$  на рис. 7), и остальных протонов молекулы, окружающих этот фрагмент (обозначенных индексом  $l$ ), на объемы кросс-пиков между протонами  $NH$ ,  $C^\alpha H$ ,  $C^\beta H$  фрагмента при различных значениях  $\tau_c$  (1–15 нс), характерных для полипептидов с молекулярной массой 1,5–25 кДа. Для этой цели используем модели III и IV (рис. 7, III и IV).

На рис. 8 и 9 приведены результаты расчетов объемов кросс-пиков в соответствии с моделями III и IV (кривые III и IV). Различие кривых I и III демонстрирует влияние не принадлежащих дипептидному фрагменту протонов молекулы (ср. рис. 7, I и III). Различие кривых I и IV свидетельствует о влиянии «спиновой диффузии» через окружающие дипеп-

тидный фрагмент протоны молекулы (см. рис. 7, I и IV). Разность между кривыми III и IV характеризует «переход намагниченности» на окружающие дипептидный фрагмент протоны молекулы (см. рис. 7, III и IV).

Анализ кривых I—IV (рис. 8 и 9) свидетельствует, что влияние окружения увеличивается с ростом  $\tau_c$  и  $\tau_m$ . Сравнение кривых III и IV (рис. 9) показывает, что «переход намагниченности» на протоны, окружающие дипептидный фрагмент, в несколько раз превышает эффект «спиновой диффузии» через эти протоны во всем исследованном диапазоне времен  $\tau_c$  и  $\tau_m$ . С ростом  $\tau_c$  доля «спиновой диффузии» во влиянии окружения возрастает (см. кривые III и IV на рис. 9).

Проведенные расчеты показывают, что для анализа локальной структуры дипептида и ее согласования с NOESY-спектрами могут быть использованы модели III и IV (рис. 7, III и IV). Эти модели в отличие от моделей, основанных на рассмотрении попарного взаимодействия протонов (см., например, рис. 7, II), позволяют с хорошей точностью рассчитывать объемы кросс-пиков между протонами, удаленными на расстояние  $\leq 3\text{ \AA}$ , при обеспечивающих оптимальную чувствительность временах  $\tau_m$ . Кроме того, эти модели не требуют знания структуры целой молекулы.

Модель IV позволяет получить более точные значения объемов кросс-пиков, чем другие упрощенные модели. Однако для ее практического использования необходима информация о диагональных элементах матрицы релаксации целой молекулы (см. уравнения (7) и (8)). Их можно определить по временам продольной релаксации протонов при селективном возбуждении (см., например, [32]). К сожалению, времена селективной релаксации возможно в настоящее время измерять лишь для молекул, имеющих 1D ЯМР-спектр с неперекрывающимися сигналами, что существенно ограничивает область применения данной модели.

Результаты, полученные при помощи модели III (рис. 7, III), которая использует координаты и времена неселективной спин-решеточной релаксации протонов дипептидного фрагмента, слабо зависят от наличия полной и точной информации о временах неселективной релаксации протонов (см. раздел «Влияние времени продольной релаксации»). Для использования этой модели достаточна информация о характерных для однотипных протонов (NH, C<sup>n</sup>H, C<sup>β</sup>H и т. д.) временах неселективной спин-решеточной релаксации, которую можно получить методом IR [12] или IR-COSY [31]. Учитывая, что времена неселективной релаксации необходимы также для учета влияния укороченного времени  $Q$ , использование данной модели представляется наиболее практичным.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Факторы, влияющие на объемы кросс-пиков в NOESY-спектрах, многообразны и по природе, и по степени их влияния. Влияние некоторых из них можно существенно ослабить при проведении эксперимента и последующей обработке или оценить их и учесть. Влияние же факторов, обусловленных свойствами исследуемой системы, необходимо рассматривать в каждом конкретном случае. Хорошим средством для этого является математическое моделирование объемов кросс-пиков, учитывающее особенности поведения многоспиновых систем в широком диапазоне значений  $\tau_m$ .

В данной работе мы проанализировали влияние параметров исследуемой системы (окружающих ядер, времени корреляции ( $\tau_c$ ) и времени неселективной продольной релаксации  $T_1$ ) на объемы кросс-пиков в гомоядерных протонных NOESY-спектрах полипептидов. Наибольшее влияние оказывают время корреляции ( $\tau_c$ ) и окружающие протоны. Влияние окружения проявляется в двух противоборствующих механизмах — «переходе намагниченности» на окружающие ядра и «спиновой диффузии», приводящих соответственно к понижению и повышению интенсивностей кросс-пиков. Какой из этих двух механизмов будет преобладающим, зависит от расстояния между протонами, обуславливающими рассматриваемый кросс-пик, времени  $\tau_c$  и времени  $\tau_m$ . Результаты, полученные при моделировании влияния окружения на объемы кросс-пиков, свидетельствуют о

принципиальной возможности согласования (на ранних этапах установления пространственной структуры молекулы) структуры дипептидного фрагмента молекулы с информацией, содержащейся в NOESY-спектре всей молекулы, при обеспечивающих максимальное отношение сигнал/шум временах  $\tau_m$ . С этой целью наиболее удобно использовать математическую модель III (рис. 7, III), использующую координаты и времена неселективной спин-решеточной релаксации протонов дипептидного фрагмента. Показано, что точность измерения времен неселективной продольной релаксации слабо влияет на результаты расчетов объемов кросс-пиков ЯЭО. Однако из-за эффекта «неравновесного начального состояния» при недостаточно длинных периодах  $Q$  необходимо учитывать различия во временах релаксации для сопоставления теоретического и экспериментального спектров NOESY.

### Экспериментальная часть

Времена  $T_1$  протонов грамицидина А в мицеллах додецилсульфата натрия были измерены на спектрометре WM-500 Bruker (ФРГ) при помощи импульсной последовательности IR [12]:  $RD-180^\circ-\tau-90^\circ-AQ$ , где время  $RD=10$  с, а значения  $\tau$  выбраны равными 0,3 мкс, 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 и 3,5 с. Средние времена продольной релаксации, характерные для различных типов протонов, составили 0,9 с для NH, 0,7 с для  $C^\alpha H$ , 0,5–0,6 с для протонов  $C^\beta H$ ,  $C^\gamma H$  и  $C^\delta H$ .

Все расчеты производили на ЭВМ Aspect-3000 (Bruker). Программа расчета интегральных интенсивностей сигналов в NOESY-спектрах реализована на языке Паскаль.

В работе использованы координаты протонов грамицидина А, полученные [24] по данным ЯМР-спектроскопии с последующей оптимизацией конформационной энергии. Недиагональные элементы матрицы релаксации вычисляли по уравнению (8), диагональные – по уравнению (7), используя характерные для однотипных протонов (NH,  $C^\alpha H$ ,  $C^\beta H$  и т. д.) грамицидина А времена  $T_1$ . Расчеты проводили для спектров с рабочей частотой для протонов 500 МГц.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Wuthrich K. NMR of proteins and nucleic acids. N. Y.: Wiley, 1986.
2. Bystrov V. F. // Progr. NMR Spectrosc. 1976. V. 10. Part 1. P. 41–81.
3. Bystrov V. F. // Soviet Scientific Reviews. D. Physicochemical Biology Reviews/ Ed. Sculachev V. P. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1984. V. 5. P. 207–275.
4. Noggle J. H., Schirmer R. E. The nuclear Overhauser effect. N. Y.: Acad. Press, 1971.
5. Jeener J., Meier B. H., Bachman P., Ernst R. R. // J. Chem. Phys. 1979. V. 71. № 11. P. 4546–4553.
6. Macura S., Ernst R. R. // Mol. Phys. 1980. V. 41. № 1. P. 95–117.
7. Keepers J. W., James T. L. // J. Magn. Reson. 1984. V. 57. № 3. P. 404–426.
8. Macura S., Huang Y., Suter D., Ernst R. R. // J. Magn. Reson. 1981. V. 43. № 2. P. 259–281.
9. States D. J., Habercorn R. A., Ruben D. J. // J. Magn. Reson. 1982. V. 48. № 2. P. 286–292.
10. Marion D., Wuthrich K. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1983. V. 113. № 3. P. 967–974.
11. McDonald G. G., Leigh J. S., Jr. // J. Magn. Reson. 1973. V. 9. № 3. P. 358–362.
12. Vold R. L., Waugh J. S., Klein M. P., Phelps D. E. // J. Chem. Phys. 1968. V. 48. № 8. P. 3831–3832.
13. Levitt M. H., Bodenhausen G., Ernst R. R. // J. Magn. Reson. 1984. V. 58. № 3. P. 462–472.
14. Comisarow M. B., Melka J. D. // Analyt. Chem. 1979. V. 51. № 13. P. 2198–2203.
15. Lindon L. C., Ferrige A. G. // Progr. NMR Spectrosc. 1980. V. 14. Part 1. P. 27–66.
16. Weiss G. H., Ferretti J. A., Byrd R. A. // J. Magn. Reson. 1987. V. 71. № 1. P. 97–105.
17. Mehlkopf A. F., Korbee D., Tiggelman T. A., Freeman R. // J. Magn. Reson. 1984. V. 58. № 2. P. 315–323.
18. Otting G., Widmer H., Wagner G., Wuthrich K. // J. Magn. Reson. 1986. V. 66. № 1. P. 187–193.
19. Zuiderweg E. R. P., Hallenga K., Olejniczak E. T. // J. Magn. Reson. 1986. V. 70. № 2. P. 336–343.
20. Denk W., Wagner G., Rance M., Wuthrich K. // J. Magn. Reson. 1985. V. 62. № 2. P. 350–355.
21. Glaser S., Kalbitzer H. R. // J. Magn. Reson. 1986. V. 68. № 2. P. 350–354.
22. Barsukov I. L., Arseniev A. S. // J. Magn. Reson. 1987. V. 73. № 1. P. 148–149.
23. Denk W., Baumann R., Wagner G. // J. Magn. Reson. 1986. V. 67. № 2. P. 386–390.
24. Arseniev A. S., Barsukov I. L., Bystrov V. F., Lomize A. L., Ovchinnikov Yu. A. // FEBS Lett. 1985. V. 186. № 2. P. 168–174.

25. Арсеньев А. С., Ломизе А. Л., Барсуков И. Л., Быстров В. Ф. // Биол. мембраны. 1986. Т. 3. № 11. С. 1077-1104.
26. Bull T. E. // J. Magn. Reson. 1987. V. 72. № 3. P. 397-413.
27. Bodenhausen G., Ernst R. R. // J. Amer. Chem. Soc. 1982. V. 104. № 5. P. 1304-1309.
28. Bremer J., Mendz C. L., Moore W. J. // J. Amer. Chem. Soc. 1984. V. 106. № 17. P. 4691-4696.
29. Kalk A., Berendsen H. J. C. // J. Magn. Reson. 1976. V. 24. № 3. P. 343-366.
30. Tropp J. // J. Chem. Phys. 1980. V. 72. № 11. P. 6035-6043.
31. Arseniev A. S., Sobol A. G., Bystrov V. F. // J. Magn. Reson. 1986. V. 70. № 3. P. 427-435.
32. Mirau P. A., Bovey F. A. // J. Amer. Chem. Soc. 1986. V. 108. № 17. P. 5130-5134.
33. Freeman R., Hill H. D., Tomlinson B. L., Hall L. D. // J. Chem. Phys. 1974. V. 61. № 11. P. 4466-4473.
34. Niccolai N., Pogliani L., Rossi C., Corti P., Gibbons W. A. // Biophys. Chem. 1984. V. 20. № 3. P. 217-223.
35. Perrin C. L., Gipe R. K. // J. Amer. Chem. Soc. 1984. V. 106. № 14. P. 4036-4038.
36. Olejniczak E. T., Gampe R. T., Fesik S. W. // J. Magn. Reson. 1986. V. 67. № 1. P. 28-41.
37. Braun W., Go N. // J. Mol. Biol. 1985. V. 186. № 3. P. 611-626.
38. Jardetzky O., Lane A., Lejevre J. F., Neiburge O. NMR in life sciences/Eds Bradbury E. M., Nicolini C. N. Y.: Plenum Press, 1986. P. 49-72.
39. Billiter M., Braun W., Wuthrich K. // J. Mol. Biol. 1982. V. 155. № 3. P. 321-346.

Поступила в редакцию  
24.11.1988

{PRINCIPLES OF QUANTITATIVE ANALYSIS  
OF TWO-DIMENSIONAL NOESY SPECTRA IN DETERMINATION  
OF PEPTIDE AND PROTEIN SPATIAL STRUCTURE

SOBOL A. G., ARSENIIEV A. S.

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

To elucidate potentialities of two-dimensional homonuclear Overhauser effect (NOESY) spectra of peptides and proteins for their spatial structure determination, impact of experimental parameters and intrinsic properties of the investigated molecule on proton cross-peak volumes in NOESY spectra was analysed. Recommendations which could increase accuracy of cross-peak volume measurements were suggested. Influence of intrinsic properties of a molecule (spin-lattice relaxation times  $T_1$ , correlation time  $\tau_c$  and surrounding protons) on the volume of cross-peak for particular protons was analyzed using a complete relaxation matrix of the  $\overrightarrow{\pi_{LD}^{6,3}\pi_{LD}^{6,3}}$  helix of gramicidin A. Nonselective relaxation time  $T_1$  of the protons was found to affect only slightly the results of cross-peak volumes computer simulation, whereas correlation time  $\tau_c$  and surrounding protons seriously influenced cross-peak volumes. Nevertheless, cross-peak volumes between NH, C $^\alpha$ H and C $^\beta$ H protons of a dipeptide fragment of the entire molecule could be accurately simulated using the relaxation matrix of the individual dipeptide. Thus local conformations (torsion angles  $\phi$ ,  $\psi$  and  $\chi^1$ ) of amino acid residues could be deduced independently of one another and prior to the complete analysis of a molecular structure. The result can be obtained even in the presence of spin-diffusion at mixing times providing maximal volumes of cross-peaks in NOESY spectra.