



УДК 577.322.5:543.422.25

**СПЕКТРОСКОПИЯ ЯМР В ИССЛЕДОВАНИЯХ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ  
СТРУКТУРЫ МЕМБРАННЫХ ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ**

© 1995 г. К. В. Первушин, А. С. Арсеньев\*

*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 13.01.94 г.

В обзоре обсуждены проблемы, связанные с установлением пространственного строения мембранных пептидов и белков методом спектроскопии ЯМР высокого разрешения. Анализируются полученные этим методом данные о пространственной структуре и внутримолекулярной динамике мембраносвязанных форм около 30 пептидов и белков, таких, как некоторые гормоны, нейропептиды, липопептиды, пептидные антибиотики, белки оболочки бактериофагов и трансмембранные участки интегральных мембранных белков. В тех случаях, когда удается подобрать адекватную искусственную среду сольubilизации (органические растворители, мицеллы детергентов или везикулы липидов), спектроскопия ЯМР позволяет получать уникальную информацию о строении и динамике мембранных пептидов и белков, что является основой для исследования их структурно-функциональных связей.

*Ключевые слова: спектроскопия ЯМР; мембранные белки; пространственная структура белков; везикулы липидов; мицеллы детергентов.*

**ВВЕДЕНИЕ**

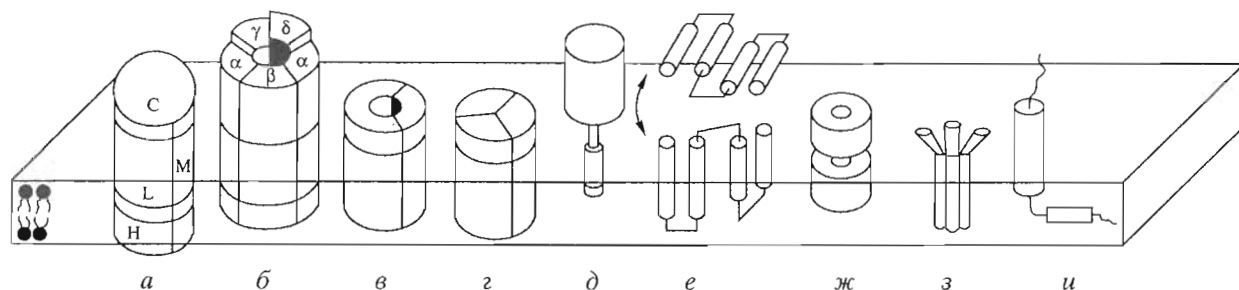
Определение пространственной структуры мембранных пептидов и белков часто является наиболее критическим этапом при выяснении механизма их действия. Хотя количество белков,

для которых известна последовательность аминокислотных остатков, превышает 40 000, детальная пространственная структура установлена главным образом рентгеноструктурным анализом и тесно связанными с ним другими дифракционными методами всего для нескольких сотен водорастворимых белков и некоторых мембранных белковых комплексов. На данный момент неизвестна структура высокого разрешения ни для одного мембранного белка в нативном окружении. Получение детальной структурной информации существующими методами значительно затруднено, так как требует, как правило, подбора искусственной среды сольubilизации белков или получения детергент-белковых кристаллов. К настоящему времени структура всего нескольких мембранных белков известна с разрешением менее 0.2 нм. Однако эти данные позволили получить общие представления о строении мембранных белков.

Строение основных типов мембранных белков схематически показано на рис. 1. Модели (координаты атомов) пептидов и белков, как правило, представлены в различных банках данных трехмерных структур, например в Brookhaven Data Bank [1]. Обычно мембранные комплексы содержат несколько субъединиц. Мембранные белки, участвующие в преобразовании энергии клетки, состоят из субъединиц, пронизывающих мембрану, а также нескольких субъединиц, ассоциированных с поверхностью мембраны. Структура

Список сокращений: Aib – остаток  $\alpha$ -аминоизомасляной кислоты, ANF – артериальный натриуретический фактор крысы, BP – бактериородопсин, GA – грамицидин A, GRP – пептид, высвобождающий гастрин, DG – дистанционный геометрический алгоритм, DM – *n*-додецилмальтозид, DMPC – димиристоилфосфатидилхолин, DMSO – диметилсульфоксид, DOPE – 1- $\alpha$ -диолеилфосфатидилэтанолламин, DPPG – дипальмитоилфосфатидилглицерол, DPC – додецилфосфатидилхолин, tEGF – фактор роста клеток мыши, HMQC – двумерный спектр корреляции химических сдвигов сигналов гетероядер, HONANA – двумерная гомоядерная спектроскопия Хартмана–Хана, HuIv – остаток  $\alpha$ -гидроксиизовалериановой кислоты, Lac – остаток молочной кислоты, LPC – лизофосфатидилхолин, LPC-SH – лизофосфатидилхолинсульфатид, LPE – лизофосфатидилэтанолламин, MD – молекулярная динамика, MMPC – мономиристоилфосфатидилхолин, NOESY – двумерные (2M) спектры ЯЭО, OTG – октилтиоглюкопиранозид, PC – фосфатидилхолин, PS – фосфатидилсерин, PLA – фосфолипаза A<sub>2</sub>, PE – фосфатидилэтанолламин, Phol – остаток фенилаланинола, RMSD – среднеквадратичное отклонение, ROESY – двумерная спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат, SDS – додецилсульфат натрия, TRNOE – ЯМР-спектроскопия переданного ЯЭО, TOCSY – тотальная корреляционная спектроскопия, ХПЯ – химическая поляризация ядер, ЭКМ – электронная криомикроскопия, ЯМР – ядерный магнитный резонанс, ЯЭО – ядерный эффект Оверхаузера.

\*Автор для переписки – Арсеньев Александр Сергеевич (тел.: 330-59-29, 330-74-83).



**Рис. 1.** Схематическое представление строения основных типов мембранных белков (латинские и греческие буквы обозначают различные субъединицы). *а* – фотосинтезирующие реакционные центры, *б* – лигандуправляемые ионные каналы (ацетилхолиновый рецептор), *в* – неселективные поры, образованные тримерами порина, *г* – тримеры бактериородопсина пурпурных мембран, *д* – бактериальные аспартатные рецепторы, *е* – трансмембранные домены некоторых бактериальных токсинов (колицина А, стрелка указывает переход между поверхностным и трансмембранным состояниями), *ж* – трансмембранные селективные каналы димера грамицидина А, *з* – неселективные ионные каналы олигомеров пептидных антибиотиков (аламетицин, мелиттин), *и* –  $\alpha$ -спиральные белки оболочки филаментных бактериофагов.

двух таких комплексов была получена с разрешением 0.18 - 0.23 нм. Это фотосинтезирующие реакционные центры из двух видов бактерий, *Rhodospseudomonas viridis* и *Rhodobacter sphaeroides* [2], кристаллизованные в виде белок-детергентного комплекса с детергентом N,N-диметилдодециламин-N-оксидом. Фотосинтезирующий реакционный центр *Rh. viridis* (см. рис. 1а) состоит из 4 субъединиц (Н, L, М и С). Субъединицы L и М содержат по 5 трансмембранных  $\alpha$ -спиральных участков, атом железа и пигментные кофакторы, субъединица Н пронизывает мембрану одной трансмембранной  $\alpha$ -спиралью. Цитохром с (субъединица С) не содержит трансмембранных участков и связан с субъединицами L и М на экзоплазматической стороне мембраны.

Лигандуправляемые ионные каналы состоят обычно из нескольких сходных субъединиц, имеющих трансмембранные  $\alpha$ -спиральные участки и области, значительно выступающие над поверхностью мембраны. Например, ацетилхолиновый рецептор, структура которого получена с очень низким разрешением, порядка 2.0 нм [3], состоит из 5 сходных субъединиц ( $\alpha_2\beta\gamma\delta$ ), каждая из которых проникает через мембрану, выступая из нее более чем на 2.0 нм (рис. 1б).

Матричный порин является примером мембранного белка, почти полностью погруженного в мембрану, имеющего в отличие от других мембранных белков вторичную структуру типа  $\beta$ -листа [4]. Комплексы такого типа, образующие неселективные поры, состоят, как правило, из нескольких идентичных субъединиц (рис. 1в).

Светопоглощающие белки, такие, как бактериородопсин и хлорофилл-белковый комплекс II гороха, также имеют олигомерную структуру, состоящую из идентичных или почти идентичных субъединиц (рис. 1г). Их структура получена [5, 6] с использованием методов электронной криоми-

кроскопии (ЭКМ) с разрешением 0.35 нм в направлении поверхности мембраны и 1.0 нм в перпендикулярном направлении. Достигнутое разрешение позволило построить модель молекулы бактериородопсина, передающую лишь общие мотивы укладки основной цепи [5].

Некоторые мембранные белки имеют значительный по размерам функциональный домен, заякоренный на мембране одной трансмембранной  $\alpha$ -спиралью (рис. 1д). После протеолитического отщепления трансмембранного участка функциональный домен удается закристаллизовать в высокоупорядоченные кристаллы. Таким путем была исследована пространственная структура бактериального аспартатного рецептора [7], антигена HLA-A2 гистосовместимости [8] и некоторых других мембранных белков (см. для обзора [9]).

Особый класс мембранных белков представляют некоторые бактериальные токсины, являющиеся водорастворимыми белками, образующими при связывании с мембраной гидрофильные поры. К настоящему времени установлена с разрешением порядка 0.25 нм пространственная структура трансмембранных доменов четырех токсинов в водорастворимой форме – колицина А [10],  $\delta$ -эндотоксина [11], дифтерийного токсина [12] и экзотоксина А [13] (рис. 1е).

Некоторые пептидные антибиотики образуют трансмембранные селективные (грамицидин А) и неселективные (аламетицин, мелиттин) ионные каналы, как правило в димерном или олигомерном состоянии (рис. 1ж, з). После кристаллизации из органических растворителей были получены высокоупорядоченные кристаллы и установлена пространственная структура грамицидина А [14], аламетицина [15] и мелиттина [16]. Однако полученная структура грамицидина А, так называемая форма 3, не соответствует конформации ионного канала.

Особый случай представляют  $\alpha$ -спиральные белки оболочки филаментных бактериофагов (рис. 1*и*), образующие трансмембранные тяжи при атаке мембраны бактерий вирусом [17 - 19].

Лимитирующая стадия при использовании методов рентгеновской и/или электронной микроскопии в исследовании структуры мембранных белков – их кристаллизация [20]. Обычно для этой цели используют различные типы детергентов, представляющих собой водорастворимые амфифильные молекулы с массой 200 - 650 Да и содержащих гидрофильную головку и гидрофобный хвост [21]. В зависимости от химического строения детергенты делятся на неионные и заряженные. В воде при концентрации выше некоторой критической детергенты образуют мицеллы в виде сферических или вытянутых частиц, содержащих 30 - 200 молекул. Характеристики мицелл сильно зависят от природы детергента. При включении молекулы белка в мицеллу, как правило, не происходит изменения количества молекул детергента в мицелле. По-видимому, солюбилизация белков из мембраны с помощью детергентов является наиболее надежным путем получения высокоупорядоченных кристаллов. Солюбилизация в органических растворителях приводит, как правило, к полной или частичной денатурации мембранных белков, что в конечном итоге препятствует образованию правильных кристаллов [20].

Спектроскопия ЯМР высокого разрешения твердого тела позволяет получать структурную информацию для белков как в кристаллическом, так и в порошкообразном состоянии, а также для белков, иммобилизованных в липидных бислоях или везикулах [22]. Таким образом, нативное мембранное окружение белка оказывается подходящей средой для исследования его конформации методом спектроскопии ЯМР твердого тела. Этот метод предъявляет менее жесткие требования к упорядочиванию и ориентированию образца, чем рентгеноструктурный анализ или электронная микроскопия, однако требует развития методик селективного изотопного замещения в белках, что ограничивает применение метода в настоящее время [22].

Использование оптических методов, таких, как спектроскопия кругового дихроизма и вибрационная (комбинационное рассеяние и инфракрасная) спектроскопия, позволяет исследовать пространственную структуру мембранных комплексов в нативном окружении [23]. Эти методы обладают большой гибкостью в исследовании пространственной структуры, однако с их помощью можно получать данные только о вторичной структуре полипептидной цепи белка и ее изменении в процессе его функционирования.

Значительные успехи в развитии представлений о строении и функционировании сложных мембранных систем достигнуты при использовании различных теоретических методов, как правило основывающихся на экспериментально полученных пространственных структурах белков. Например, на основании анализа трехмерных гидрофобных потенциалов трансмембранных  $\alpha$ -спиралей [24] предложены модели ассоциации этих спиралей для различных классов мембранных белков. Методы компьютерного моделирования внутримолекулярной динамики белков [25] позволили оценить конформационную подвижность отдельных участков полипептидной цепи белка оболочки филаментного бактериофага Pf1 и сопоставить результаты с данными ЯМР [26]. Однако обзор теоретических методов выходит за рамки данной статьи.

Спектроскопия ЯМР высокого разрешения в растворе является эффективным методом для изучения пространственной структуры и механизмов функционирования белков размером 15 - 20 кДа [27, 28]. Зачастую это единственный метод, дающий детальную информацию о структуре и динамике белков и пептидов, конформация которых зависит от мембранного окружения. Основные трудности этого метода связаны с тем, что ширина сигналов в спектре ЯМР зависит от скорости движения молекул и пропорциональна размерам исследуемой системы. В результате даже для небольших пептидов в липидных бислоях сигналы в спектре  $^1\text{H}$ -ЯМР настолько уширены, что из спектра невозможно получить информацию о строении молекул. Одним из путей решения проблемы является подбор искусственной среды, которая сохраняет функционально значимую структуру молекулы и позволяет получить спектр ЯМР высокого разрешения. Обычно используют несколько типов искусственной среды: везикулы и бислои липидов, мицеллы детергентов и органические растворители. Применение обращенных мицелл детергентов при исследовании пространственной структуры мембранных белков ограничено, так как получаемые белок-детергентные комплексы значительно превосходят 30 кДа, что делает невозможным разрешение индивидуальных линий в спектрах  $^1\text{H}$ -ЯМР [29, 30]. Для каждого конкретного случая изучения пространственной структуры мембранного белка или пептида методом ЯМР подбор искусственной среды оказывается решающим фактором.

При достижении необходимого разрешения сигналов в спектрах ЯМР оказывается возможным получать информацию о пространственной сближенности протонов в молекуле белка или протонов, относящихся к различным взаимодействующим молекулам (например, комплекса липид-белок), с помощью ядерного эффекта

Оверхаузера (ЯЭО) [28, 31]. Использование пептидов и белков, обогащенных  $^{15}\text{N}$ - и/или  $^{13}\text{C}$ -изотопами, позволило существенно увеличить предельный размер исследуемых белков, а также исследовать динамическое поведение каждого аминокислотного остатка в широких временных диапазонах (от 10 пс до 10 нс и от 0.1 мс до сотен часов) [32].

Данные о доступности остатков Tyr, Trp и His для растворителя получают, исследуя эффект поляризации протонов боковых цепей в циклических реакциях передачи электрона с фотовозбужденного красителя (фотохимическая поляризация ядер (фото-ХПЯ)), например 3-N-карбоксиметиллюмифлавина [33]. Положение белка по отношению к мембране может быть определено с использованием парамагнитных сдвигающих и уширяющих реагентов [28] или методом спинового зонда [34].

Мембранные пептиды и белки, пространственная структура которых служила предметом ЯМР-исследования, можно условно разделить на две группы. К первой относятся водорастворимые мембраносвязывающиеся пептиды, как правило амфифильной природы, чья активная конформация в значительной степени определяется наличием раздела водной и гидрофобной фаз, ко второй – сильно гидрофобные трансмембранные и интегрированные в мембране белки. Первая группа включает ряд гормонов, нейропептиды, сигнальные пептиды, липопептиды, ионофоры, пространственная структура которых рассматривается в первой части обзора. Ко второй группе можно отнести трансмембранные  $\alpha$ -спиральные участки белков-рецепторов,  $\alpha$ -спиральные пептиды, формирующие поры в мембране, белки оболочки бактериофагов, индуцирующие слияние фагов с плазматической мембраной клетки, амфипатические  $\alpha$ -спирали аполипопротеиновых частиц плазмы, способные формировать дискоидальные мицеллы при взаимодействии с фосфолипидными липосомами. Мембранные участки белков второй группы, как правило, представляют собой трансмембранные  $\alpha$ -спирали, ассоциированные между собой. Этим белкам и пептидам посвящена вторая часть обзора.

## 1. БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С МЕМБРАНОЙ

### 1.1. Исследование пространственной структуры пептидных гормонов

В последнее время показано, что многочисленные гормоны и нейропептиды, рецепторы которых сопряжены с G-белками, взаимодействуют с фосфолипидными мембранами. Сюда входят опиоидные пептиды, динорфин А, мастопаран X, вещество P, глюкагон, нейротензин, нейропептид Y,  $\alpha$ -фактор деления клетки, брадикинин и некоторые другие гормоны. Полагают, что биологичес-

кая активность этих пептидов обусловлена их сродством к фосфолипидной мембране и, как правило, амфифильной конформацией в мембраносвязанном состоянии [35 - 38]. Методами спектроскопии  $^1\text{H}$ -ЯМР показано, что в водных растворах и DMSO, моделирующих свойства транспортных жидкостей, эти пептиды, как правило, не обладают жесткой фиксированной конформацией и высокоподвижны [39 - 41]. Согласно представлению, развитому Р. Швицером [35], такие пептидные гормоны на пути к месту связывания на рецепторе, проходя через анизотропную среду, характеризующуюся наличием структурированной воды на границе раздела гидрофильной и гидрофобной областей, уменьшением диэлектрической проницаемости среды, приобретают все более упорядоченную конформацию перед связыванием с рецептором. Была выдвинута гипотеза, согласно которой связывание нейропептидов и гормонов с соответствующим рецептором происходит в липидной фазе мембраны или на ее поверхности [35]. Таким образом, особый интерес вызывает изучение влияния взаимодействия пептида с липидной мембраной на его конформацию еще до образования комплекса с рецептором.

Некоторые нейропептиды и гормоны (опиоидные пептиды, динорфин А) имеют несколько рецепторов-мишеней. Полагают, что с разными рецепторами пептид связывается в разных конформациях, которые, в свою очередь, определяются физическими характеристиками мембранного окружения сайта связывания и его расположением относительно мембраны [42]. Метод ЯМР уникален по возможностям получения детальной информации о строении и динамике мембраносвязанных пептидов. При этом выбор подходящей среды, моделирующей биологическую мембрану, определяет успех исследования. Обычно используют несколько типов модельных сред: органические растворители, мицеллы детергентов, везикулы и бислои липидов.

### 1.1.1. Использование мицелл детергентов и органических растворителей при исследовании пространственной структуры гормонов и мембраноактивных белков

Взаимодействие пептида с мембраной можно определить как внутреннее или внешнее в зависимости от того, проникает ли пептид в гидрофобную область или связывается только на поверхности мембраны [36]. Положение пептида в мембране определяют электростатические взаимодействия его заряженных групп с зарядами поверхности мембраны, силы поверхностной адсорбции и гидрофобные взаимодействия. При исследовании конформации мембраносвязанного пептида и его взаимодействия с мембраной в качестве моделей

биологической мембраны часто используют анионный детергент додецилсульфат натрия (SDS) или цвиттер-ионный липид додецилфосфатидилхолин (DPC), образующие в водных растворах в широком диапазоне концентраций (100 - 600 мМ) мицеллы диаметром приблизительно 3.0 и 2.5 нм и содержащие соответственно 60 - 80 или 50 - 60 молекул детергента [43, 44]. Эти детергенты моделируют биологические мембраны, составленные из липидов двух основных классов: анионных и цвиттер-ионных [45]. Поскольку конформация поверхностно-активных пептидов во многом определяется взаимодействием с анизотропной поверхностью раздела фаз, использовании изотропных сред органических растворителей в качестве модельных систем ограничено [37].

Пространственная структура [Leu]- и [Met]энкефалинов исследовалась методами двумерной спектроскопии (2М)  $^1\text{H}$ -ЯМР в органических растворителях (диметилформамиде и ацетонитриле), различных криопротекторных смесях (90% диметилформамид/10% вода, 90% этиленгликоль/10% вода, 90% метанол/10% вода) при низких (277 К) температурах [39] и в мицеллах SDS, лизофосфатидилхолина (LPC) [36] и лизофосфатидилхолинсульфатида (LPC-SH) [46]. В двумерных (2М) спектрах ЯЭО (NOESY) проведено отнесение кросс-пиков и показано, что в органических растворителях и криопротекторных смесях наиболее вероятной конформацией энкефалинов является  $\beta$ -изгиб 4 $\rightarrow$ 1, тогда как в мицеллах детергентов энкефалины приобретают конформацию  $\beta$ -изгиба 5 $\rightarrow$ 2. Взаимодействие энкефалинов с мицеллами SDS и DPC можно отнести к внешнему типу, так как они не проникают в гидрофобную фазу мицелл [36]. Предполагается, что существование двух различных предпочтительных конформаций энкефалинов обуславливает их способность воздействовать на  $\mu$ - и  $\delta$ -опиоидные рецепторы [39].

Линейный пептид динорфин А взаимодействует с несколькими типами опиоидных рецепторов, а также имеет неопиоидную активность [42]. Исследование пространственной структуры фрагмента 1 - 17 динорфина А методами  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии в воде и метаноле [47] показало, что в этих средах пептид обладает набором конформаций. При этом участок Arg7-Asp15 преимущественно имеет конформацию  $\beta$ -листа. Однако взаимодействие фрагмента 1 - 17 динорфина А с мицеллами DPC приводит к стабилизации конформации  $\alpha$ -спирали на участке Gly3-Arg9 [42]. Таким образом, в разных средах динорфин А находится в разных конформациях, которые могут обуславливать разные типы его активности.

Исследования пространственной структуры линейного нонапептидного тканевого гормона брадикинина, играющего ключевую роль во мно-

гих воспалительных процессах и взаимодействующего с несколькими разными рецепторами, методами оптической и ЯМР-спектроскопии в воде и DMSO [48] показали, что пептид в этих средах не имеет предпочтительной конформации. Для того чтобы выяснить корреляцию активной конформации гормона с его биологической функцией, необходимо охарактеризовать структуру брадикинина в комплексе с соответствующим рецептором. Поскольку решение такой задачи находится за пределами современных методов ЯМР-спектроскопии, для моделирования амфифильного окружения встроенных в мембрану рецепторов брадикинина использовали мицеллы детергентов SDS [48] и LPC [36]. На основании анализа объемов кросс-пиков в спектре NOESY и констант спин-спиновой взаимодействия протонов с последующим расчетом с помощью дистанционного геометрического алгоритма (DG) и моделированием молекулярной динамики (MD) предложена пространственная модель брадикинина в мицеллах SDS [48]. Полученные модели сходны между собой и содержат развернутый N-концевой участок, тогда как C-концевой участок (остатки 6 - 9) пептида имеет фиксированную конформацию  $\beta$ -изгиба, стабилизированную водородными связями. Высокое значение среднеквадратичного отклонения (RMSD) между координатами тяжелых атомов полученных структур (около 0.4 нм) указывает на то, что брадикинин сохраняет значительную конформационную подвижность и в связанном с мицеллой состоянии. В мицеллах DPC брадикинин имеет похожую структуру, однако оказывается еще более подвижным. Таким образом, оптимальной средой с точки зрения реализации предпочтительной конформации пептида являются мицеллы SDS, однако характер взаимодействия пептида с мицеллой SDS, а также положения его в мицелле остаются невыясненными.

Взаимодействие брадикинина и вещества P с мицеллами SDS можно, по-видимому, считать внутренним, так как встраивание этих гормонов в мицеллы приводило к существенному (более 30%) увеличению скоростей релаксации атомов  $^{13}\text{C}$  ацильной части молекулы детергента [36], а в спектрах NOESY [36] наблюдали кросс-пики ЯЭО между протонами  $\text{C}^\alpha\text{H}$ - и  $\text{C}^\beta\text{H}$ -групп детергента и протонами боковых цепей ароматических остатков пептидов. Напротив, встраивание [Met]энкефалина, вещества P и брадикинина в мицеллы DPC не приводило к заметному изменению скоростей релаксации ядер  $^{13}\text{C}$  липида, а в спектрах NOESY не удалось обнаружить кросс-пики, соответствующие межмолекулярным взаимодействиям. Таким образом, взаимодействие этих пептидов с мицеллами DPC относится к внешнему типу [36].

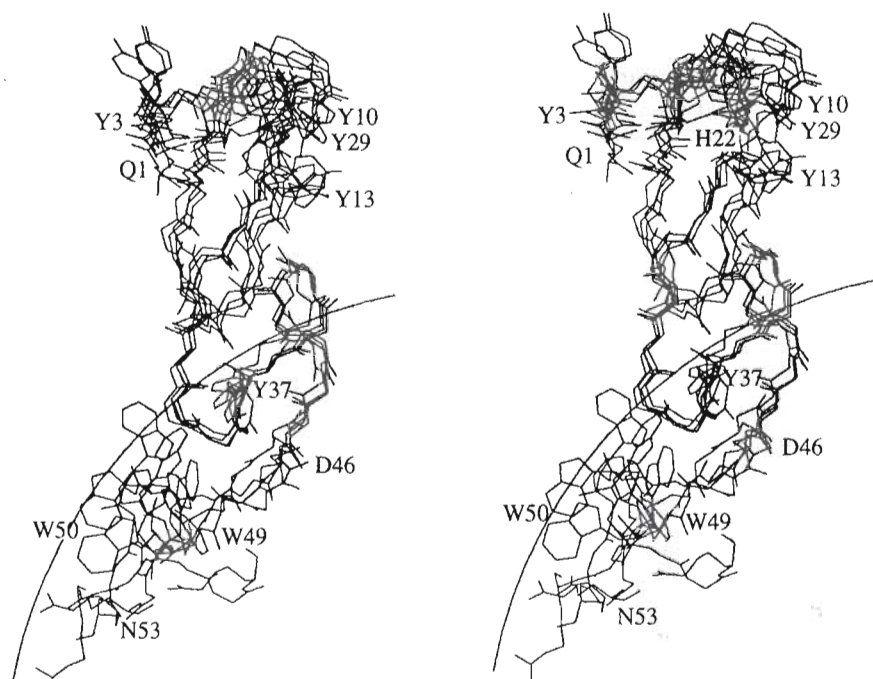


Рис. 2. Стереорепрезентация совмещенных по  $C^\alpha$ -атомам пяти моделей пространственной структуры фактора роста мышцы в мицеллах DPC, полученных по данным ЯМР [55]. Дугой показано предполагаемое расположение поверхности мицеллы. Здесь и далее положение отдельных аминокислотных остатков указано в однобуквенном коде.

Конформации  $\beta$ -эндорфина и его фрагментов 6 - 31, 18 - 31, 1 - 27, 1 - 16 и 12 - 26 исследованы в мицеллах SDS, использованных как модель липидов мозга – цереброзидсульфатов [49]. Показано, что в отличие от полностью неупорядоченной структуры в растворах в мицеллах SDS реализуется достаточно “жесткая” конформация пептида. В спектрах NOESY обнаружены кросс-пики между протонами аминокислотных остатков, соответствующие  $\alpha$ -спиральной конформации на участке 14 - 22. На участке 24 - 25 реализуется  $\beta$ -изгиб типа I. Участок 1 - 12, по-видимому, находится в неупорядоченной конформации, что противоречит предположению Жардетского и сотр. [50] о наличии  $\alpha$ -спирального мотива на этом участке пептида, выдвинутого на ранних этапах исследования пространственной структуры  $\beta$ -эндорфина. Доступность растворителю ароматических остатков  $\beta$ -эндорфина в мицеллах SDS [51] и додецилфосфатидилхолина (C12PN) [52] исследовалась с помощью фото-ХПЯ. Показано [51, 52], что при физиологических значениях pH остатки Tyr1 и Tyr27 иммобилизованы в гидрофобной фазе мицелл.

Тридекапептид нейротензин, гормон с широким спектром биологической активности, исследовали в водном растворе, метаноле и в мицеллах SDS [53]. В водном растворе и метаноле спектры  $^1H$ -ЯМР пептида соответствовали структуре неупорядоченного клубка (random coil). При связывании с мицеллой участок Glu4–Arg8 приобретал развернутую конформацию, а пептидная связь

Arg9–Pro10 – *цис*-конфигурацию. Авторы работы [53] указывают, что во всех исследованных средах нейротензин сохраняет высокую подвижность, однако при связывании с мицеллами конформационная варибельность средней части молекулы уменьшалась, что могло приводить к образованию биологически активной конформации. По-видимому, нейротензин локализуется на поверхности мицелл, что позволяет отнести его взаимодействие с мицеллами к внешнему типу.

Для фактора роста клеток мышцы (mEGF), состоящего из 53 аминокислотных остатков, установлена пространственная структура в водном растворе [54] и в присутствии мицелл DPC [55]. На рис. 2 показан набор из 5 результирующих конформаций mEGF в мицеллах DPC, реконструированных с помощью DG-алгоритма с последующей минимизацией конформационной энергии. Основная часть пептида (участок Glu1–Asp46) имеет конформацию антипараллельной  $\beta$ -структуры в растворе и мицеллах детергента, тогда как конформация C-концевого участка 46 - 53 существенно зависит от среды. В присутствии мицелл участок 46 - 53 приобретает развернутую конформацию с амфифильной поверхностью и располагается, по-видимому, на поверхности мицеллы. Участок Glu1–Asp46 оказывается жестко фиксированным по отношению к C-концевой области. По данным о затухании анизотропии флуоресценции остатков триптофана mEGF связывается с мицеллами DPC с константой диссоциации

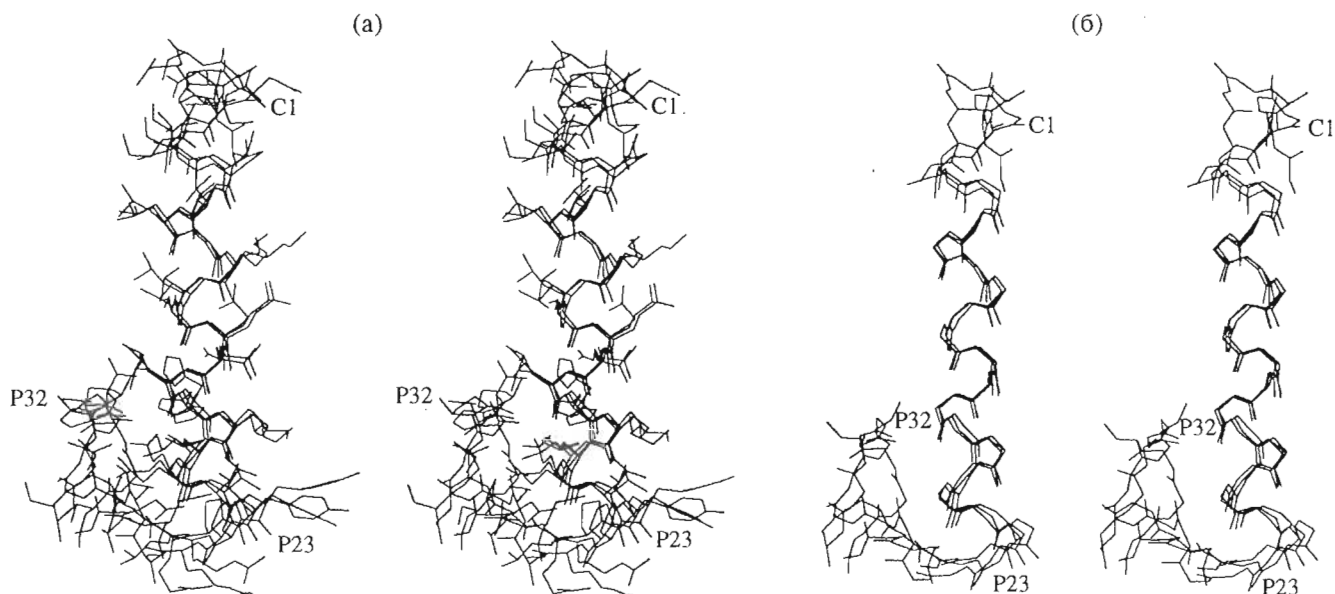


Рис. 3. Стереоразложение совмещенных по  $C^\alpha$ -атомам трех моделей пространственной структуры кальцитонина в мицеллах SDS, полученных по данным ЯМР [60]. Показаны все атомы, за исключением атомов водорода (а), и атомы O, C,  $C^\alpha$  и N основной цепи (б).

0.1 мМ при 28°C и pH 7.0 и не взаимодействует с везикулами фосфатидилхолина (PC) и фосфатидилсерина (PS) [55]. Доступность растворителю остатков Tyr, Trp и His mEGF в мицеллах DPC и SDS изучалась методом фото-ХПЯ [56]. Показано, что в мицеллах как DPC, так и SDS остатки Tyr37, Trp49 и Trp50 оказываются в области контакта пептида с мицеллой. Остатки Tyr3, Tyr10, Tyr13, His22 и Tyr29 экспонированы в водную фазу. Учитывая полученные данные, на рис. 2 показали предполагаемое положение фактора роста по отношению к поверхности мицеллы. В мицеллах SDS и DPC mEGF имеет сходные конформации. Авторы работы [55] пришли к выводу, что в данном случае мицеллярная система моделирует скорее предполагаемый гидрофобный участок связывания рецептора, а не мембранное окружение.

Конформация синтетического нейропептида Y (36 аминокислотных остатков), гормона, вызывающего понижение давления, определена в трифторэтанол [57]. Структура пептида характеризуется наличием  $\alpha$ -спирального участка Arg19–Gln34 и отсутствием упорядоченной конформации в N-концевой области. Возможно,  $\alpha$ -спиральный участок при взаимодействии с биомембраной оказывается углубленным в гидрофобную фазу, тогда как N-конец пептида располагается на границе раздела фаз.

Мицеллы DPC были использованы в качестве модели бислоистой мембраны при исследовании конформации бомбезина (19 аминокислотных остатков) [58] и пептида, высвобождающего гастрин (GRP) (18 аминокислотных остатков) [59].

Бомбезин и GRP являются соответственно агонистом и антагонистом бомбезин/GRP-рецептора. Конформация агониста на участке Gln2–Leu9 представляет собой псевдоспираль, сформированную тремя последовательно соединенными  $\beta$ -изгибами: Gln2–Val5, Ala4–His7 и Gly6–Leu9. Аналогичная конформация получена для антагониста на участке Gln2–His7, но третий  $\beta$ -изгиб, присутствующий у агониста, разрушен из-за введения  $\psi(CH_2S)$ -группы между остатками Phe8 и Leu9. По-видимому, разница в биологическом эффекте GRP и бомбезина связана именно с наличием или отсутствием указанного структурного элемента.

Пространственная структура (рис. 3) и внутримолекулярная динамика кальцитонина (32 аминокислотных остатка), гормона, регулирующего концентрацию  $Ca^{2+}$  в крови, исследованы в присутствии мицелл SDS методом спектроскопии ЯМР [60]. Кальцитонин в мицеллах SDS представляет собой интересный пример молекулы с динамическим обменом между конформациями, который можно обнаружить методами  $^1H$ -ЯМР. При конформационных расчетах не удалось получить удовлетворительного согласования теоретически рассчитанных и экспериментальных объемов кросс-пиков в спектре NOESY для одной конечной конформации пептида. Однако, усредняя межпротонные расстояния в конформациях, находящихся в обмене, это согласование удается получить. Кальцитонин содержит  $\alpha$ -спираль на участке 6–22, в области остатка Pro23 происходит поворот полипептидной цепи, так что виток спирали 26–31 направлен противоположно ходу

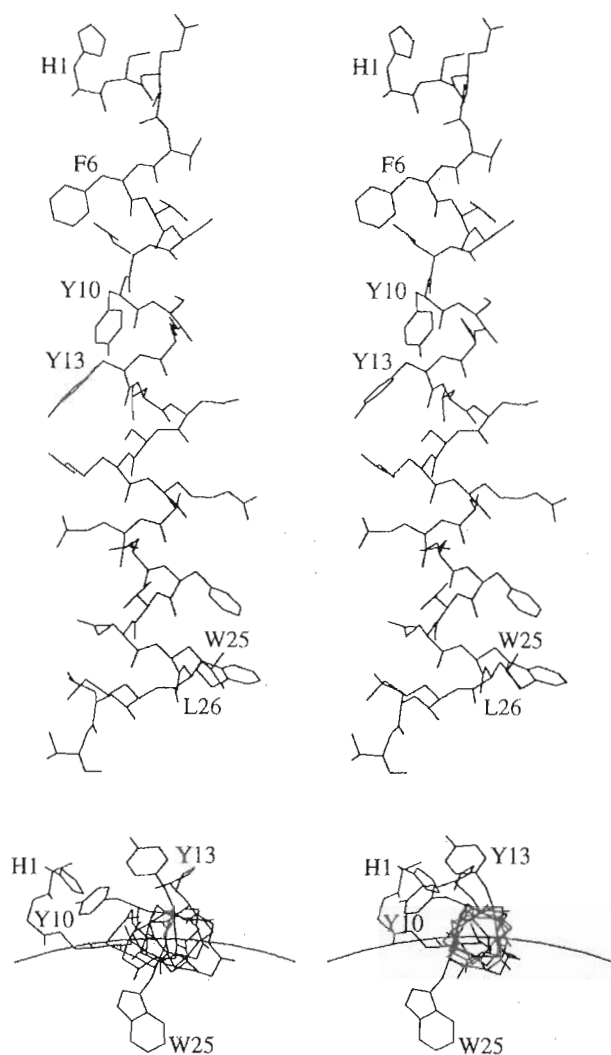


Рис. 4. Стереорепрезентация модели пространственной структуры глюкагона в мицеллах DPC, полученной по данным ЯМР [64]. Приведены две ориентации модели. Дугой показано расположение поверхности мицеллы.

$\alpha$ -спирали 6 - 22 (рис. 3). Именно структурные различия в районе Pro23 определяют существование набора конформаций кальцитонина, находящихся в динамическом равновесии между собой.

Методами  $^1\text{H}$ - и  $^{15}\text{N}$ - (естественное содержание) ЯМР исследовалась структура гастрин I (17 аминокислотных остатков) и [дез-Trp1, Nle12]-мини-гастрин, гормонов желудочно-кишечного тракта, солюбилизированных в смеси трифторэтанол-вода [61] и мицеллах SDS [62]. В этих средах остаток Met5 и пять следующих остатков Glu находились в конформации  $\alpha$ -спирали, а участок -Ala11-Tyr12-Gly13-Trp14- образовывал  $\beta$ -изгиб. Предполагается [61], что обнаруженная предпочтительная конформация соответствует активной.

Методами ЯМР изучалась также циклическая часть (аминокислотные остатки 7 - 23) артериаль-

ного натриуретического фактора крысы (ANF) – гормона, регулирующего артериальное давление, солюбилизированного в мицеллах SDS [63]. С помощью DG-алгоритма и моделирования внутримолекулярной динамики получен набор из нескольких конформаций, хорошо согласующихся с экспериментальными ЯМР-данными. В мицеллах SDS в отличие от изотропных растворителей ANF приобретает более жесткую предпочтительную конформацию, при этом отдельные остатки сохраняют высокую конформационную подвижность. Структура содержит три конформационно сходных фрагмента 8 - 12, 14 - 17 и 18 - 21, представляющих собой подобие  $\beta$ -изгибов, подвижных друг относительно друга. Предполагается, что при взаимодействии с гидрофобным сайтом связывания на рецепторе происходит фиксация вторичной структуры пептида.

Одна из пионерских работ в области применения методов 2М-спектроскопии ЯМР и DG-алгоритма для установления конформации мембраносвязанных пептидов в мицеллах DPC посвящена структуре глюкагона (29 аминокислотных остатков), антагониста инсулина. Связывание глюкагона с соответствующим рецептором способствует выводу глюкозы из клеток печени, а специфическое связывание его с рецептором плазматической мембраны активирует аденилатциклазу. Авторы работы [64] предположили, что взаимодействие глюкагона с клеточной мембраной индуцирует формирование его активной конформации, и использовали мицеллы DPC в качестве модели мембраны. Установлено, что глюкагон в мицеллах DPC имеет жесткую структуру, близкую к  $\alpha$ -спирали на участке 6 - 26. Структура  $\alpha$ -спирали на участке 14 - 17 несколько искажена, N-концевой участок 1 - 5 не имеет определенной структуры, а C-концевой фрагмент 26 - 29 имеет развернутую конформацию (рис. 4). Пространственная структура гормона имеет выраженный амфифильный характер, что приводит к расположению гормона параллельно поверхности мицеллы. Аналогичная пространственная структура глюкагона установлена в смеси трифторэтанол-вода (4 : 1) [65]. В мицеллах DPC остатки His1, Tyr10 и Tyr13 экспонированы в водную фазу, тогда как Trp25 погружен в липидное ядро мицеллы. Таким образом, глюкагон локализуется на поверхности мицеллы, располагаясь так, что ось  $\alpha$ -спирали оказывается почти параллельной плоскости поверхности (рис. 4).

Принимая во внимание сходство структуры глюкагона в смеси трифторэтанол-вода и мицеллах DPC, Марион и сотр. [67] выбрали эту смесь в качестве среды, моделирующей гидрофобную фазу мембраны, при исследовании пространственной структуры пептидного антибиотика маганина-2 (23 аминокислотных остатка) из кожи африканской лягушки. Добавление 8% трифтор-



этанола к водному раствору магаинина-2 приводит к практически полному переходу пептида из состояния неупорядоченного клубка в спираль. Детальный расчет конформации пептида не проводился, но на основании анализа относительных интенсивностей кросс-пиков ЯЭО сделан вывод о том, что реализующаяся структура представляет собой  $\alpha$ -спираль, а не спираль  $3_{10}$ . Этот вывод весьма важен, так как в конформации  $\alpha$ -спирали пептид приобретает амфифильные свойства, что может приводить к олигомеризации молекул антибиотика, находящихся на поверхности мембраны, и объяснять последующее образование ионпроводящих трансмембранных каналов [67].

### 1.1.2. Везикулы липидов – наиболее адекватная модель биологической мембраны

Большинство исследований пептид-мембранных взаимодействий выполнено с использованием мицелл детергентов в качестве систем, моделирующих биологическую мембрану. Однако упаковка молекул детергента и фосфолипидов в мицеллах отличается от упаковки в бислойной мембране. При этом бислойная фосфолипидная мембрана является, по-видимому, более адекватной моделью биомембраны. В работе Миязавы и соотр. [41] методом переданного ЯЭО (TRNOE) исследованы конформации [Leu]энкефалина, [D-Ala2, Leu]энкефалина, [D-Ala2, Leu]энкефалинамида (агонист) и [L-Ala2, Leu]энкефалина (неактивный аналог), находящихся в динамическом равновесии связанных и несвязанных форм с фосфатидилхолиновыми/фосфатидилсериновыми бислойными везикулами. Активные пептиды при связывании с мембраной приобретают на участке Gly3–Phe4 одинаковую конформацию  $\beta$ -изгиба типа II' и  $\gamma$ -изгиба для остатка Gly2 (или D-Ala2). При этом в связанном с везикулой состоянии остаток Tyr1 локализуется на поверхности мембраны. Аналогичная конформация обнаружена для [MeI]- и [Leu]энкефалинов в органических растворителях [39]. Неактивный пептид имел иную конформацию, которая характеризуется сближенностью ароматических боковых цепей остатков Tyr1 и Phe4. Полученные данные указывают на то, что неактивный аналог энкефалина в отличие от активных нейропептидов иммобилизован в липидном бислое и взаимодействует с липидами по внутреннему типу.

Несмотря на то что в экспериментах TRNOE можно использовать более адекватную биологическую мембрану модельную систему фосфолипидных везикул, успех подхода во многом зависит от большого количества экспериментальных параметров. Наиболее критическими являются концентрация пептида, состав фосфолипидов и их концентрация, pH, температура и ионная сила. Используя TRNOE, можно исследовать структуру

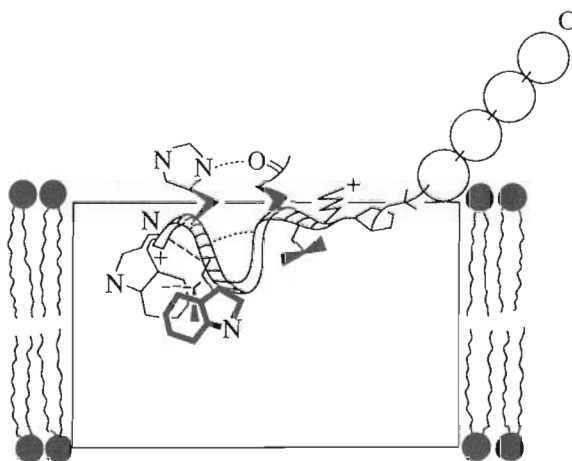


Рис. 5. Схема расположения основной цепи и боковых цепей остатков Тир  $\alpha$ -фактора слияния клеток в фосфолипидной мембране по данным [69]. Четыре С-концевых остатка, экспонированных в растворителе, показаны кружками.

сравнительно небольших пептидов. Так, например, в присутствии фосфатидилхолиновых везикул удалось исследовать конформацию тетрадекапептида мастопарана X из яда осы, активатора G-белка [68]. Используя ограничения на межпротонные расстояния, полученные по интенсивностям кросс-пиков в спектре NOESY, рассчитали пространственную структуру пептида. Ее особенностью является то, что 12 С-концевых остатков из 14 образуют амфифильную  $\alpha$ -спираль (три боковых цепи остатков лизина на одной стороне и гидрофобные боковые цепи на другой стороне спирали). Эта конформация мастопарана X сохранялась и при переходе модельной мембраны из фазы геля в жидкокристаллическую фазу.

С помощью метода TRNOE исследована пространственная структура  $\alpha$ -фактора слияния клеток *Saccharomyces cerevisiae* (19 аминокислотных остатков) в присутствии фосфолипидных везикул [69]. Этот пептид взаимодействует с рецептором на поверхности гаплоидных клеток, что в конечном итоге приводит к их слиянию [70]. Конформация пептида исследовалась в присутствии везикул нейтральных липидов 1- $\alpha$ -дипальмитилфосфатидилхолина, 1- $\alpha$ -диолеилфосфатидилэтаноламина (DOPE), 1- $\alpha$ -дистеароилфосфатидилхолина и анионных липидов фосфатидилинозита, фосфатидилсерина (PS) и 1- $\alpha$ -дипальмитоилфосфорной кислоты. По-видимому, пептид не взаимодействует с везикулами DOPE и подвижен при взаимодействии с везикулами PS. В остальных средах структура пептида содержала  $\beta$ -изгиб типа II на участке 7 - 10 с *транс*-конфигурацией пептидной связи Gln10–Pro11,  $\alpha$ - или  $3_{10}$ -спираль на N-концевом участке 1 - 5 и неупорядоченный С-концевой участок 11 - 13 (рис. 5). Полагают, что основным

фактором, ответственным за активность пептида, является наличие  $\beta$ -изгиба типа II на участке 7 - 10.

Исследование липидиндуцированной конформации нейромодулятора вещества P, ундекапептида, проведено в присутствии мицелл SDS, лизофосфатидилглицерина и лизофосфатидилхолина (LPC) [36, 71]. Авторы работы [71] предположили наличие  $\alpha$ -спиральной конформации на участке Pro4-Phe8, который участвует в связывании с рецептором. Проведено  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-исследование синтетических аналогов вещества P,  $^{13}\text{C}$ -меченных по  $\text{C}^\alpha$ -атомам остатков Gly2 и Gly9, в везикулах LPC и PS [72]. Показано присутствие двух форм пептида (погруженный в липидную фазу и находящийся на границе раздела фаз в равновесии с не связанной с липидами формой), измерены кинетические параметры перехода из одной формы в другую [72].

Спектроскопия ЯМР позволила исследовать конформационные изменения мембраноактивных комплексов пептидной и депсипептидной природы [73] при их функционировании. Такие комплексы способны в растворах связывать катионы, включая их во внутреннюю полость молекулы. Ион, будучи "упакован" внутри макроцикла, хорошо экранирован от взаимодействия со средой и противоионами, что позволяет перенести его через мембрану. Одним из первых представителей мембраноактивных комплексов, структура которого была получена методами ЯМР, стал депсипептидный антибиотик валиномицин, построенный из трех идентичных тетрадепсипептидных фрагментов *D*-Val-*L*-Lac-*L*-Val-*D*-Hiv (Lac – остаток молочной кислоты, Hiv – остаток гидроксизовалериановой кислоты). По K/Na-избирательности валиномицин превосходит все известные макроциклы и поэтому широко применяется для индуцирования калиевой проницаемости мембран. Установлено [74], что для растворов валиномицина характерно равновесие трех основных форм. Форма А (так называемый браслет  $A_2$ ), стабилизированная шестью внутримолекулярными водородными связями (все группы HN включены во внутримолекулярные Н-связи), существует в неполярных растворителях ( $\text{CCl}_4$ ,  $\text{CHCl}_3$ ). Форма В реализуется в растворах средней полярности ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ), в ней группы HN остатков *D*-Val образуют внутримолекулярные водородные связи, а группы HN остатков *L*-Val сольватированы растворителем. Наконец, в DMSO и других полярных средах валиномицин не имеет фиксированной конформации. Несмотря на значительную молекулярную массу, везикулы димиристоилфосфатидилхолина (DMPC), моделирующие бислоюную биологическую мембрану, оказались подходящей искусственной средой для установления положения и ориентации молекулы валиномицина в мембране, а также для исследования кинетики связывания катионов с использованием сдвиговых и

уширяющих реагентов [75]. Конформация валиномицина в неполярных средах органических растворителей (форма А), а также конформация, возникающая в этих же средах при связывании катиона  $\text{K}^+$ , установленная методами ЯМР Быстрым и сотр. [76], сохраняются в везикулах DMPC [75]. В свободном состоянии молекула валиномицина находится в глубине (не менее 1.0 нм от поверхности) липидного бислоя, а в связанном с катионом состоянии – вблизи заряженной поверхности. При этом обмен между двумя формами валиномицина является быстрым в шкале времен ЯМР (менее чем 1 мс) [75]. Валиномицин представляет собой пример пептида, взаимодействующего с мембраной по внутреннему типу [36].

### 1.2. Липопроотеины

Липопроотеины составляют класс полипептидов, которые имеют в своем химическом составе помимо аминокислотных остатков также ковалентно связанные остатки жирной кислоты. Иногда к этому классу относят полипептиды, образующие прочные комплексы с некоторыми липидами. Как правило, липопроотеины активно взаимодействуют с биологическими мембранами и приобретают определенную пространственную структуру только в комплексе с липидами.

Процессы транспорта холестерина в организме осуществляются посредством специфических липопротеиновых частиц. Эти комплексы представляют собой большие сферические частицы (220 нм в диаметре), содержащие молекулы холестерина, окруженные липидным бислоем с встроенным липопротеином (250 кДа). Поскольку аполипопроотеины взаимодействуют с липидами в основном на  $\alpha$ -спиральных участках [37], для исследования таких взаимодействий использовали синтетические модельные пептиды, соответствующие  $\alpha$ -спиральным участкам аполипопротеина [77]. Так, исследовалось взаимодействие синтетического пептида (18 аминокислотных остатков), соответствующего  $\alpha$ -спиральному фрагменту липопротеина, с плоскими дисками DMPC [77]. Селективное  $^{13}\text{C}$  изотопное замещение  $\text{C}^\beta$ -атома остатка Ala11 выявило три сигнала от трех форм пептида, обменивающихся между собой: пептид, не связанный с DMPC, связанный на плоской поверхности диска и на его боковой стороне. При перенесении пептида в везикулы DMPC остается только один сигнал ядра  $^{13}\text{C}$ , соответствующий расположению пептида на поверхности диска. Поскольку  $\alpha$ -спираль имеет выраженный амфифильный характер, предполагается, что пептид располагается параллельно поверхности липидного бислоя.

Используя зависимости интенсивностей кросс-пиков в спектрах NOESY и ROESY (2М-спектро-

скопия ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат) от температуры и времена релаксации  $T_1$  и  $T_2$ , а также ЯЭО ядер  $^{13}\text{C}$  (естественное содержание) тетрадекапептидного антибиотика стендомицина, Джинест и соавт. [78] предложили пространственную структуру и карту конформационной подвижности пептида, солюбилизованного в DMSO. Конформации стендомицина [79] и сходных липопептидов итурина А [80] и микосубтилина [81] исследованы также в трифторэтанол. Эти липопептиды содержат два специфических аминокислотных остатка: стендомидин и дигидробутирин, а также остаток жирной кислоты  $\text{C}_{13}\text{H}_{27}\text{CO}$ . Семь аминокислотных остатков стендомицина образуют лактонный цикл. Линейный участок полипептидной цепи имеет достаточно жесткую вытянутую структуру, контактирующую с относительно подвижным лактонным кольцом. Механизм действия антибиотика точно не установлен, однако предполагается [79] стендомидин нарушает упаковку липидов при взаимодействии с бислоистой мембраной. Конформация итуриновых липопептидов сильно зависит от среды солюбилизации и значительно отличается в трифторэтанол и DMSO [78]. В данной ситуации использование мицелл детергентов, видимо, позволило бы установить конформацию липопептидов, реализующуюся при взаимодействии с биомембраной.

В некоторых случаях липопептиды, находящиеся в неупорядоченной конформации во всех изотропных растворителях, приобретают определенную вторичную структуру при взаимодействии с поверхностью фосфолипидной мембраны. Так, в работе [82] методами спектроскопии  $^1\text{H}$ -ЯМР в сочетании с компьютерным моделированием исследована предпочтительная конформация модельного пептида Ac-Lys-Gly-Arg-Gly-Asp-Gly с липидным якорем (2,3-дипальмитоил-*D*-(+)-глицериновой кислоты), ковалентно присоединенным к боковой цепи остатка Lys и встроенным в мицеллы DPC. В мицеллах DPC пептид имел конформацию  $\beta$ -изгиба типа II. Удалось также установить взаимную ориентацию липидной и пептидной частей молекулы и ее положение в мицелле [82]. Такой подход может оказаться перспективным для установления конформации участков полипептидной цепи, соединяющих гидрофобные трансмембранные фрагменты интегральных мембранных белков.

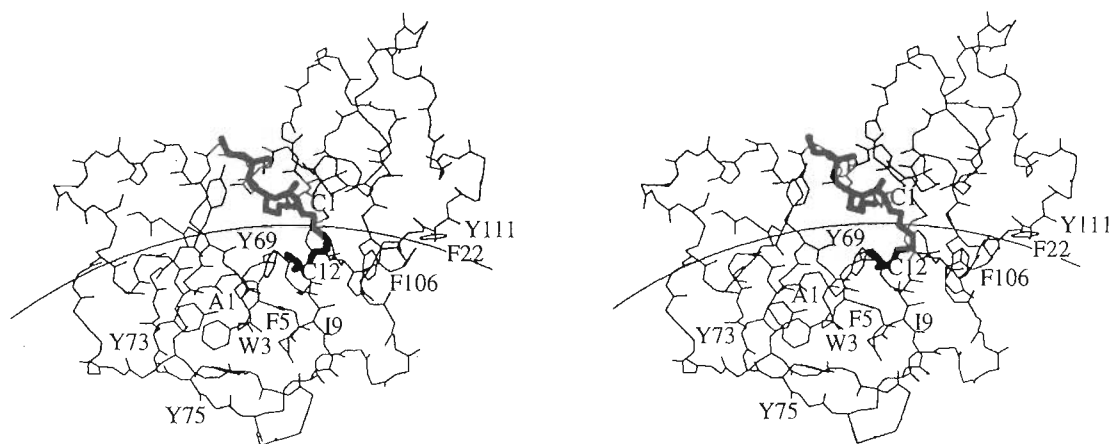
### 1.3. Белки и пептиды, функциональная активность которых зависит от мембранного окружения

Функциональная активность некоторых ферментных комплексов часто зависит от присутствия биологической мембраны как фактора, опре-

деляющего конформацию субстрата, а также правильную ориентацию фермента на поверхности, необходимую для образования сайта связывания субстрата. Одним из таких белков является фосфолипаза  $\text{A}_2$  (PLA), кальцийзависимый фермент, который специфически дезацилирует фосфоглицериды по 2-му положению. Установлено, что PLA обладает низкой активностью для субстрата в мономерной форме, однако на поверхности мембраны или мицеллы детергентов активность PLA повышается более чем на 4 порядка [83].

Спектроскопия  $^1\text{H}$ -ЯМР в сочетании с использованием мицелл DPC в качестве модели липидной мембраны оказалась эффективной при исследовании пространственного строения комплекса PLA с ингибитором (*R*)-додецил-2-аминогексанол-1-фосфогликолом [83]. Наблюдаемые линии в спектрах  $^1\text{H}$ -ЯМР комплекса PLA-ингибитор-мицелла DPC с молекулярной массой 38 кДа (что соответствует молярному соотношению белок/детергент 1 : 68) оказались достаточно узкими, что позволило получить хорошо разрешенные двумерные спектры TOCSY (тотальная корреляционная спектроскопия) и NOESY, провести отнесение большинства сигналов протонов в спектрах и установить пространственную структуру комплекса. Сравнение химических сдвигов протонов для PLA, комплексов PLA-ингибитор и PLA-ингибитор-мицелла позволило установить поверхность-знающий сайт, образованный остатками Ala1, Trp3, Phe63 и Tyr64 (рис. 6), при этом остатки Phe22, Tyr73, Tyr75, Phe106 и Tyr111 участвуют в процессе связывания с мицеллой. В спектрах NOESY идентифицированы кросс-пики, соответствующие ЯЭО-контактам между жирнокислотной цепью ингибитора и боковыми цепями остатков Phe5, Ile9, Phe22 и Phe106, что позволило определить сайт связывания ингибитора и его положение в комплексе (рис. 6). Только в присутствии мицелл DPC ингибитор связывается с большой константой связывания ( $K_d < 10$  мкМ) и в стехиометрическом соотношении (1 : 1). При этом сайт связывания образуют остатки Phe5, Ile9, Phe22, His48, Tyr52 и Phe106, а ацильная цепь ингибитора находится в гидрофобном контакте с остатками Phe5, Ile9, Phe22 и Phe106. Методом фото-ХПЯ установлено [83], что остатки Trp3 и Tyr69 углублены в липидное ядро мицеллы. Основываясь на полученных данных, можно указать предполагаемое положение PLA в мицелле DPC (рис. 6). По-видимому, именно контакт PLA с липидной мембраной приводит к правильной ориентации фермента и формированию сайта связывания субстрата.

Методы многомерного  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - или  $^{15}\text{N}$ -ЯМР оказываются эффективными при исследовании пространственной структуры и взаимодействия с модельными мембранными системами небольших (до 30 кДа) полипептидов в растворе [27].



**Рис. 6.** Стереобразение модели пространственной структуры фосфолипазы  $A_2$ , полученной методом рентгеноструктурного анализа [152]. Сходная структура фосфолипазы  $A_2$  в комплексе с ингибитором в мицеллах DPC получена по данным ЯМР [83]. Дугой показано предполагаемое расположение поверхности мицеллы. Толстой линией выделено положение ингибитора (*R*)-додецил-2-аминогексанол-1-фосфогликола.

Использование  $^{19}\text{F}$ -ЯМР позволяет выйти за этот предел и получать структурную информацию даже для больших мембраносвязанных белков (20 - 90 кДа), встроенных в мицеллы детергентов или везикулы липидов. Замещение протонов отдельных химических групп белка на атомы фтора в сочетании с генно-инженерными методами сайт-направленного мутагенеза позволяет получать уникальную структурную информацию. В качестве примера можно привести исследование взаимодействия мембранного фермента *D*-лактатдегидрогеназы (65 кДа), встроенного в мицеллы гептаэтиленгликольдодецилового эфира ( $\text{C}_{12}\text{E}_7$ ), DPC, SDS, Triton X-100, смешанные мицеллы SDS/Triton X-100 или везикулы дипальмитоилфосфатидилглицерола (DPPG) [84]. Отнесение сигналов  $^{19}\text{F}$  пяти фторированных остатков триптофана проводилось при последовательной замене триптофанов на другие остатки методом сайт-специфического мутагенеза. С использованием гидрофобной парамагнитной метки и эффекта изменения химического сдвига при изотопном замещении протонов растворителя на дейтерий показано, что Trp59 и Trp567 экспонированы в растворитель, а остальные 3 остатка Trp находятся в поверхностном слое гидрофобной фазы мицелл на глубине около 1.0 нм. Полученные данные свидетельствуют, что третичная структура фермента не зависит от используемого детергента (за исключением Triton X-100) или липида.

Нонадекапептидный антибиотик Ro09-0198 из *Streptovorticillium griseovorticillatum* не является липопептидом, так как не имеет ковалентно связанной липидной части. Антибиотик Ro09-0198 содержит различные неcodируемые аминокислотные остатки: лантионин,  $\beta$ -метиллантионин, лизоаланин и  $\beta$ -гидроксиаспарагиновую кислоту,

причем первые три образуют внутримолекулярные ковалентные мостики. В мембране пептид образует специфические устойчивые комплексы с фосфатидилэтаноламином (PE) и лизофосфатидилэтаноламином (LPE) [85]. При этом происходит увеличение ионной проницаемости мембраны. Пептид нерастворим в метаноле, ацетонитриле и трифторэтаноле, а в водных растворах он сильно агрегирует. Пространственная структура Ro09-0198 в свободном состоянии и в комплексе с LPE исследовалась в DMSO методами спектроскопии  $^1\text{H}$ -ЯМР [85]. При связывании LPE конформация пептида сильно изменяется. Анализ изменений химических сдвигов сигналов протонов пептида и кросс-пиков в спектре NOESY между протонами Ro09-0198 и протонами этаноламинной группы LPE позволил определить сайт связывания и конформации взаимодействующих молекул. В контакте с сайтом связывания пептида, который образуют остатки 6, 7, 8, 9, 12 и 13, находится только глицерофосфоэтаноламинный домен липида, однако ацильная часть липида также необходима для образования комплекса.

Участки связывания с мицеллами DPC основного белка клеток миелина мозга, содержащего 179 остатков, а также его протеолитических фрагментов были установлены с помощью уширяющей сигналы ЯМР спиновой метки, ковалентно связанной с жирной кислотой [86]. Несмотря на достаточно большой размер (18.3 кДа), белок не обладает определенной вторичной структурой в растворе и является чрезвычайно подвижным. По-видимому, он остается достаточно подвижным и при взаимодействии с мицеллами DPC, так как при оценочной молекулярной массе комплекса мицелла-белок в 96 кДа в спектре  $^1\text{H}$ -ЯМР детектируются узкие линии, позволяющие провести

отнесение их к индивидуальным протонам с использованием протеолитического расщепления нативного белка. Исследования с помощью спиновой метки позволили определить несколько мест взаимодействия полипептидной цепи с гидрофобным ядром мицеллы. Было сделано предположение, что необычно узкие линии в спектрах  $^1\text{H}$ -ЯМР связаны с отсутствием компактной структуры белка в комплексе с мицеллами DPC. По-видимому, только некоторые участки белка проникают в гидрофобную фазу мицеллы и слабо с ней взаимодействуют.

Сигнальный нонадекапептид митохондриального фермента аденилатдегидрогеназы в изотропных растворителях (за исключением трифторэтанола) не обладает определенной вторичной структурой. Однако мицеллы DPC индуцируют появление двух амфифильных  $\alpha$ -спиральных участков, соединенных коротким сегментом -Lys11-Gly12-Pro13- [87], причем, судя по скоростям обмена амидных протонов на дейтерий растворителя,  $\alpha$ -спираль С-концевого участка пептида более стабильна. По-видимому, эта часть полипептидной цепи погружена в гидрофобную фазу мицелл с ограниченным доступом для молекул растворителя. Авторы работы [87] предложили модель безрецепторной транслокации сигнального пептида через митохондриальную мембрану. Эта модель предполагает ассоциацию  $\alpha$ -спиралей в мембране так, что гидрофильные участки поверхности спиралей оказываются обращенными друг к другу, при этом общая поверхность становится гидрофобной и пептид пересекает мембрану.

Применение спектроскопии ЯМР позволило установить пространственную структуру и изучить внутримолекулярную динамику ряда мембраносвязанных пептидов и белков, конформация которых сильно зависит от среды сольubilизации или от характеристик границы раздела фаз вода/мембрана или мицелла. В качестве сред, моделирующих условия биологических мембран, использовались криопротекторные смеси, органические растворители, мицеллы детергентов, везикулы различных мембранных липидов. Поскольку большинство мембраносвязанных пептидов имеет амфифильную природу, мицеллы детергентов и липидные везикулы, обеспечивающие анизотропию раздела гидрофобной и гидрофильной фаз, являются лучшей моделью биологической мембраны по сравнению с органическими растворителями. Для возникновения активной конформации пептида определенное значение имеет упаковка липидных молекул и фазовое состояние мембраны, поэтому следует осторожно подходить к выводам о функциональной значимости конформаций пептидов, полученных с использованием мицелл детергентов. В этой связи использование везикул природных

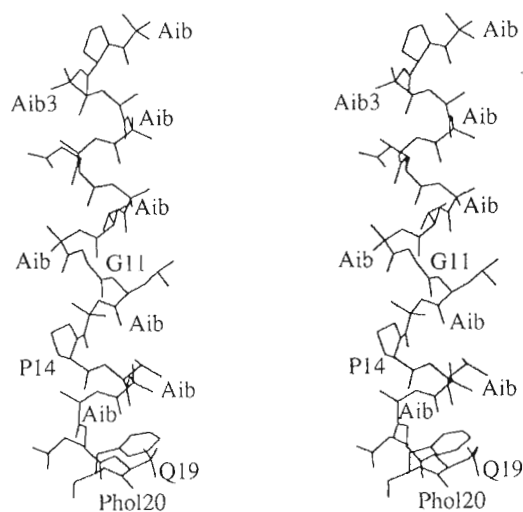


Рис. 7. Стереобразение модели пространственной структуры аламетицина в метаноле, полученной по данным ЯМР [88]. Aib и Phol – остатки  $\alpha$ -аминомасляной кислоты и фенилаланинола.

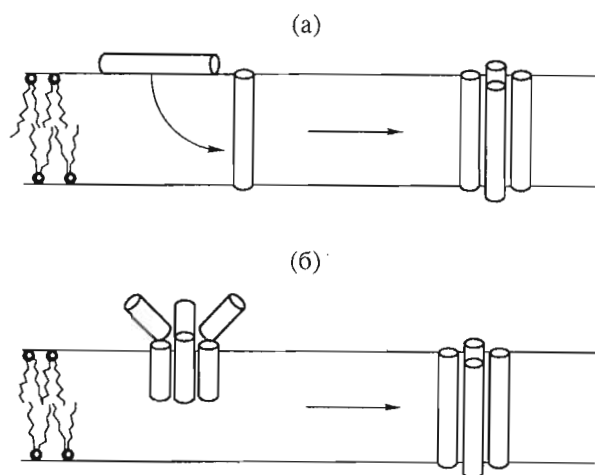
или синтетических липидов может привести к более надежным данным об “активной” конформации исследуемого пептида или белка.

## II. БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ, ИНТЕГРИРОВАННЫЕ В МЕМБРАНУ

### II.1. Каналообразующие пептиды

Определенный прогресс в понимании того, какой может быть молекулярная организация трансмембранных каналов, связан с изучением пространственной структуры молекул антибиотиков, таких, как грамицидин А, аламетицин, гомолизин.

Пространственное строение (рис. 7) и динамика антибиотика аламетицина из *Trichoderma viridae* (в состав которого входят остатки  $\alpha$ -изомасляной кислоты (Aib) и фенилаланинола (Phol)), сольubilизированного в метаноле, исследовались методами  $^1\text{H}$ - и  $^{15}\text{N}$ -ЯМР (при однородном обогащении изотопом  $^{15}\text{N}$ ) [88] и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР (естественное содержание) [89]. В липидных бислоях аламетицин образует потенциалзависимые ионные каналы. Знание пространственной структуры и динамики канала открывает пути к пониманию механизма его действия. Участок Aib3-Leu19 имеет конформацию  $\alpha$ -спирали с некоторым изгибом в области Gly11, причем, судя по дейтерообмену, наиболее жесткая ее часть локализуется на участке Aib3-Gly11. Остаток Phol20 находится в развернутой конформации. При моделировании молекулярной динамики отмечалась некоторая разупорядоченность  $\alpha$ -спиральной конформации на С-концевом участке пептида. Существует несколько моделей формирования ионного канала



**Рис. 8.** Схематическое представление двух моделей образования молекулами аламетицина неселективных ионных каналов под воздействием трансмембранной разности потенциалов: а – предполагающей изменение ориентации α-спиральной молекулы относительно мембраны; б – предполагающей изменение угла излома α-спиральной молекулы в области Pro14.

молекулами аламетицина при возникновении трансмембранной разности потенциалов [89] (рис. 8). Одни из них предполагают изменения конформации аламетицина – изменение угла излома α-спирали в положении Pro14 [90], в других структура пептида принимается жесткой [91]. Для того чтобы получить информацию о жесткости структуры аламетицина, были измерены времена релаксации  $T_1$  и  $T_2$  ядер  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$ ,  $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ - и  $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ -ЯЭО и с использованием модельнезависимого подхода вычислены обобщенные параметры порядка и времена корреляции движения индивидуальных векторов  $\text{H}-\text{N}$  и  $\text{H}-\text{C}^\alpha$  [92, 93]. Показано, что все остатки, находящиеся в α-спиральной конформации, имеют параметры порядка и времена корреляции внутреннего движения, соответствующие наличию фиксированной конформации. Если предположить, что в мембране структура аламетицина становится более жесткой, чем в метаноле, то конформация пептида не должна изменяться при формировании ионного канала. Авторы работы [88] указывают, что для выяснения вопроса о конформационных изменениях аламетицина в мембране необходимы дальнейшие исследования конформации и динамики пептида в системах, более адекватно моделирующих мембранное окружение, таких, как мицеллы детергентов.

С использованием методов  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР для двух нонадекапептидов трихолонгина VI и трихолонгина VII, антибиотиков из *T. longibrachiatum* в метаноле установлена жесткая конформация α-спирали на всем протяжении аминокислотной последовательности [94]. Как и аламетицин, трихолонгены содержат в аминокислотной последо-

вательности остатки Aib и лейцинола (Leul) и образуют трансмембранные ионные каналы, резко увеличивая неспецифическую проницаемость мембран. α-Спиральная конформация пептидов с изломом в районе остатка Pro13, присутствие которого индуцирует замыкание двух водородных связей по типу спирали  $3_{10}$ , установлена при анализе констант спин-спиновой взаимодействия протонов  $\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H}$ , температурных коэффициентов химических сдвигов сигналов амидных протонов и карбонильных углеродов, скоростей обмена лабильных протонов на дейтерий растворителя и межпротонного ЯЭО. Аламетицин и трихолонгены имеют одинаковую пространственную структуру в метаноле и, видимо, также обладают сходным механизмом биологического действия. Можно надеяться, что дальнейшие исследования динамики этих антибиотиков в других модельных средах позволят более детально исследовать механизм их биологического действия.

Основное биологическое действие мелиттина (26 аминокислотных остатков), токсина из яда пчелы, связано с его способностью нарушать структуру мембран, увеличивая ионную проводимость путем образования пор. В водных растворах мелиттин агрегирует, что затрудняет его исследование методами ЯМР [95]. Одна из первых работ по применению  $2\text{M}-^1\text{H}$ -ЯМР для установления конформации мембранных пептидов посвящена структуре и ориентации мелиттина в мицеллах DPC [96]. Структуру пептида в мицеллах DPC исследовали также другие авторы [97]. Показано, что пептид состоит из двух α-спиралей на участках 2 - 11 и 13 - 26, соединенных гибким шарниром. Угол между осями спиралей оценивался от  $120^\circ$  до  $160^\circ$  [97] (рис. 9). По изменениям релаксации протонов при добавлении спиновых меток (5-, 12- или 16-доксилстеариновой кислот или 1-гидрокси-4-додецилфосфо-2,2,6,6-тетраметилпиридина) определено положение молекулы мелиттина в мицеллах DPC [96]. Установлено, что N-концевые остатки, образующие два витка α-спирали, ориентированы приблизительно перпендикулярно поверхности мицеллы и проникают в гидрофобную фазу на глубину 0.6 - 0.8 нм, тогда как C-концевой спиральный участок располагается на поверхности мицеллы. Эксперименты по фото-ХПЯ показали, что в мицеллах DPC мелиттин ориентирован так, что остаток Trp19 углублен в липидную фазу мицеллы [66] (рис. 9). Аналогичные участки вторичной структуры установлены для мелиттина в метаноле [95]. Ширина линий пептида в метаноле позволила измерить методами  $^1\text{H}$ -ЯМР зависимость скоростей обмена лабильных протонов от псевдо-pH метанола и, таким образом, исследовать стабильность водородных связей [98]. Показано, что амидные протоны остатков 12, 13 и 15 не образуют водородных связей, что обусловлено присутствием остатка

Pro14. Для проверки влияния этого остатка на образование и стабильность водородных связей синтезирован аналог мелиттина с заменой Pro14 на Ala [99]. Оказалось, что такая замена не влияет на цитолитическую активность, но повышает стабильность водородных связей на участке 13 - 15 в 36 раз и всех остальных водородных связей в 2 - 5 раз.

Конформация и динамика основной цепи и некоторых боковых цепей мелиттина и его аналогов, в которых остатки 9, 11 и 17 замещены на Trp (аналоги сохраняют цитолитическую активность), встроенных в мицеллы мономиристоилфосфатидилхолина (ММРС), исследовались методами флуоресцентной и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии [100]. Использовались мелиттины,  $^{13}\text{C}$ -меченные по  $\text{C}^{\delta 1}$ -атому остатков триптофанов 9, 11, 17, 19 или  $\text{C}^{\alpha}$ -атому Gly12. Времена корреляции вращательного движения пептида как целого и движения боковых цепей остатков Trp и так называемые обобщенные параметры порядка вычислены из данных по затуханию анизотропии флуоресценции Trp, измерений времен релаксации  $T_1$  и  $T_2$  ядер  $^{13}\text{C}$  и гетероядерного  $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ -ЯЭО с использованием модельнезависимого подхода [92, 93]. В мицеллах ММРС время корреляции вращательного движения комплекса пептид-мицелла составляло 11.4 нс, что хорошо соответствует значению, рассчитанному исходя из предполагаемых размеров комплекса. Времена корреляции внутреннего движения составляли 123 пс для Trp9 и 30 - 40 пс для остальных Trp при том, что обобщенные параметры порядка приблизительно равны для всех остатков Trp. По-видимому, N-концевой участок пептида погружен в гидрофобную фазу мицеллы, а C-концевая  $\alpha$ -спираль остается на поверхности.

На основании полученных экспериментальных данных предложен механизм цитолитического действия мелиттина, который включает изменение ориентации двух участков  $\alpha$ -спирали друг относительно друга под действием электрического поля, что приводит к резкому нарушению порядка упаковки липидов в мембране и появлению пор, заполненных водой.

Сходное литическое действие на мембраны клеток и органелл оказывает  $\delta$ -гемолизин (26 аминокислотных остатков). В водных растворах гемолизин образует тетрамеры и агрегаты более высокого порядка, однако в мембраносвязанном состоянии гемолизин присутствует в виде мономера [101]. При исследовании конформации гемолизина методами  $^1\text{H}$ -ЯМР в качестве модели бислойной мембраны использовались мицеллы DPC [102, 103]. На участке 5 - 23  $\delta$ -гемолизина в мицеллах DPC определена  $\alpha$ -спираль. По-видимому, она располагается на границе раздела водной и гидрофобной фаз параллельно поверхности

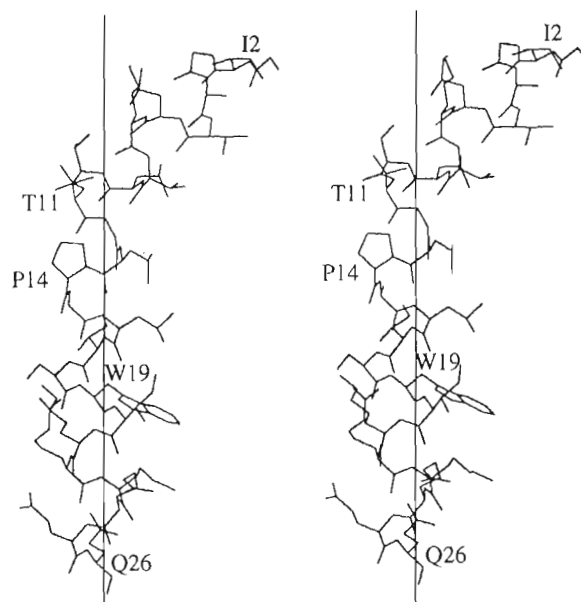


Рис. 9. Стереорепрезентация модели пространственной структуры мелиттина в мицеллах DPC, полученной по данным ЯМР [96]. N-Конец пептида погружен в липидную фазу. Линией показано расположение границы раздела фаз мицелла-вода. Остатки Ile2 и Trp19 ориентированы в липидную фазу.

мицеллы. Для  $\delta$ -гемолизина, солюбилизованного в метаноле, проведено отнесение всех сигналов протонов в 2М-спектрах ЯМР и получен набор конформаций [104]. Анализ показал, что участок 2 - 20 имеет конформацию  $\alpha$ -спирали, а C-концевой участок не образует определенной вторичной структуры. Структуры гемолизина в изотропном органическом растворителе и в мицеллах DPC практически совпадали. Таким образом, органический растворитель метанол может служить достаточно адекватной моделью липидной мембраны, в то же время являясь более простой и удобной средой для проведения ЯМР-исследований, чем мицеллы детергентов.

Грамицидин А (GA) – линейный пентадекапептид с чередующимися L- и D-аминокислотными остатками, N-конец блокирован формильной группой, а C-конец – этаноламинной. GA является полифункциональной молекулой. В бактериях *Bacillus brevis* он участвует в генетической регуляции перехода от вегетативной фазы к спорообразованию; взаимодействуя с ДНК-тироцидиновым комплексом, он приводит к активации синтеза РНК; связываясь с  $\delta$ -субъединицей РНК-полимеразы, ингибирует транскрипцию. Взаимодействие GA с биологической мембраной приводит к драматическому изменению ее проницаемости для одновалентных катионов. Вполне вероятно, что разным биологическим активностям GA должны соответствовать разные пространственные структуры молекулы. В исследованных

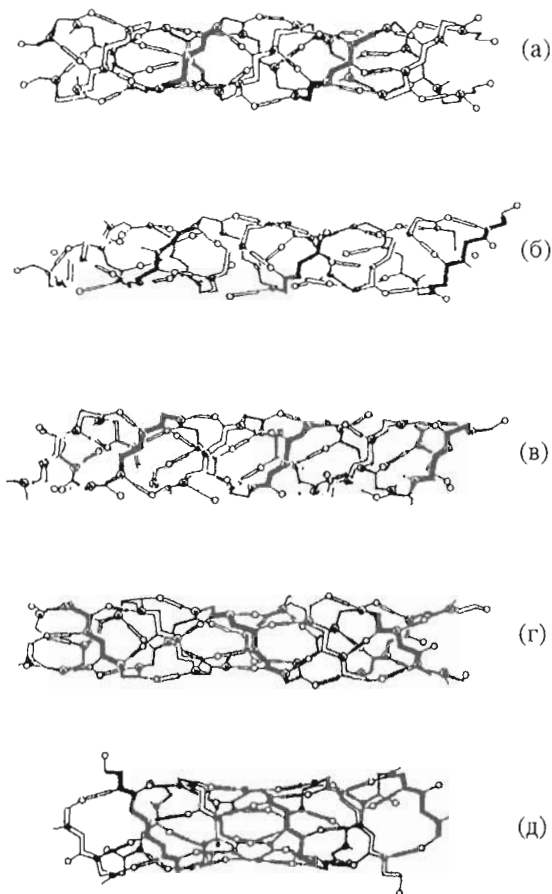


Рис. 10. Схематическое изображение пространственных структур двойных спиралей грамицидина А в органических растворителях [105]: а - г - формы 1 - 4 соответственно, д - комплекс пептида с  $\text{Cs}^+$ .

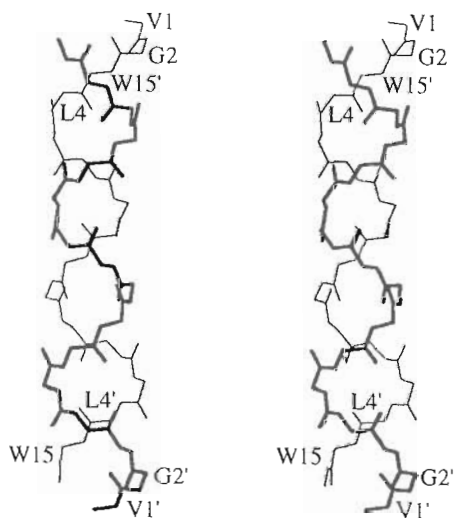


Рис. 11. Стереорепрезентация модели пространственной структуры формы 3 грамицидина А, полученной методом рентгеноструктурного анализа (кристаллизация из метанола) [109]. Показаны атомы О, С', С<sup>α</sup> и N основной цепи. Один из мономеров в димерной структуре выделен жирной линией.

средах, моделировавших биологическую мембрану, пептид присутствовал в виде димера, причем пространственная структура этого димера была различной в анизотропной среде (мембрана и мицеллы) и в изотропных органических растворителях [105].

#### Грамицидин А в органических растворителях.

В полярных средах типа диметилсульфоксида пептид не обладает определенной пространственной структурой [106 - 108]. В этаноле, диоксане, метаноле и в смеси хлороформ-метанол он находится в четырех основных конформациях, медленно (в шкале времен ЯМР) обменивающихся между собой [105]. Анализ показал, что все четыре формы являются двойными спиралью с 5.6 остатка на виток, однако они различаются направлением закрутки и взаимной ориентацией С- и N-концов. Форма 1 представляет собой левую параллельную двойную спираль, 2 - левую параллельную двойную спираль с взаимным смещением основных цепей мономеров, 3 - левую антипараллельную двойную спираль, 4 - параллельную правую двойную спираль [105] (см. рис. 10а - г). Добавление различных катионов в среду драматически изменяет конформацию грамицидина А. Образование комплекса с ионом  $\text{Cs}^+$  вызывает появление предпочтительной конформации правой антипараллельной двойной спирали с 7.2 остатка на виток (рис. 10д), тогда как  $\text{Li}^+$  и  $\text{Na}^+$  разрушают регулярную структуру пептида. При кристаллизации из метанола удалось получить высокоупорядоченные кристаллы и установить методами рентгеновской дифракции с разрешением 0.086 нм пространственную структуру пептида, соответствующую форме 3 [109]. С помощью спектроскопии ЯМР показано, что после растворения кристаллов в диоксане грамицидин А находится главным образом в конформации формы 3 (рис. 11). До настоящего времени не удалось соотносить конформационные формы GA с его биологической активностью. Тем не менее авторы работы [105] отмечают, что полученные в органических растворителях конформации пептида не соответствуют его ионпроводящей структуре, реализующейся в бислойных мембранах и DMPC-липосомах.

**Грамицидин А в мицеллах: трансмембранный ионный канал.** Используя оптическую спектроскопию кругового дихроизма, ряд авторов показали, что GA имеет сходную конформацию в мембранных системах (липосомы и везикулы фосфатидилхолина), где он формирует трансмембранный ионный канал, и в мицеллах некоторых детергентов [105]. Пептид встраивался в мицеллы различных катионных, анионных и цвиттер-ионных детергентов, таких, как додецилметиламиноксид, додецилтриметиламмонийбромид, LPC, SDS, додецилсульфат лития и др. [105]. Однако спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР, пригодные для исследования



пространственной структуры GA, удалось получить только при встраивании пептида в мицеллы SDS или додецилсульфат лития в присутствии трифторэтанола до 15% по объему образца. Показано, что GA в мицелле образует димер по схеме N-конец к N-концу, каждый из мономеров которого имеет конформацию правой  $\pi_{L,D}^{6,3}$ -спирали с 6.3 остатка на виток [110, 111]. На рис. 12 показан набор из пяти конформаций димера GA, реконструированных по данным о межпротонных расстояниях, оцененных по объемам кросс-пиков в спектре NOESY. Амидные протоны остатков *D*-Leu12, *D*-Leu14 и этаноламинной группы экспонированы в водную фазу и вследствие этого быстро обмениваются с растворителем. Димерная структура GA стабилизирована шестью водородными связями между мономерами (рис. 12).

С использованием спектроскопии  $^{23}\text{Na}$ -ЯМР показано, что встроенный в мицеллы SDS пептид сохраняет высокую специфичность связывания с одновалентными катионами металлов. Установлены также конформации аналогов GA, химически модифицированных по N-концевой аминогруппе и встроенных в мицеллы SDS. N-Ацетилированный аналог GA (ацетил-GA), так же как и ковалентно связанные момеры GA (сукцинил-бис-GA), обладали сходным с нативной формой пептида пространственным строением, однако температура разрушения димера в случае ацетил-GA на 20°C меньше соответствующей температуры (70°C) для GA, а структура сукцинил-бис-GA устойчива во всем диапазоне исследованных температур (вплоть до 85°C) [105]. Эти данные коррелируют с временем жизни трансмембранных каналов GA и его аналогов в липидной мембране, т.е. более устойчивым к повышению температуры молекулам соответствуют более долгоживущие каналы. Таким образом, в искусственной среде – мицеллах SDS – не только пространственная структура грамицидина A и аналогов, но и их термодинамическое поведение соответствуют структуре и термодинамическому поведению трансмембранных каналов этих пептидов в бислойных липидных мембранах.

В работе [112] исследована зависимость скоростей спин-решеточной релаксации протонов GA от концентрации ионов  $\text{Mn}^{2+}$  и на основе анализа этих данных определены координаты места связывания двухвалентного катиона-блокатора в устье канала. Установлено [112], что при связывании в устье канала ион  $\text{Mn}^{2+}$  сохраняет свою гидратную оболочку, стерически препятствуя проникновению в канал одновалентных ионов.

## II.2. Белки оболочки бактериофагов – модель мембранных белков

Белковая оболочка (или капсид) филаментных бактериофагов M13 и Pf1, мишенью которых являются клетки *E. coli*, состоит приблизительно

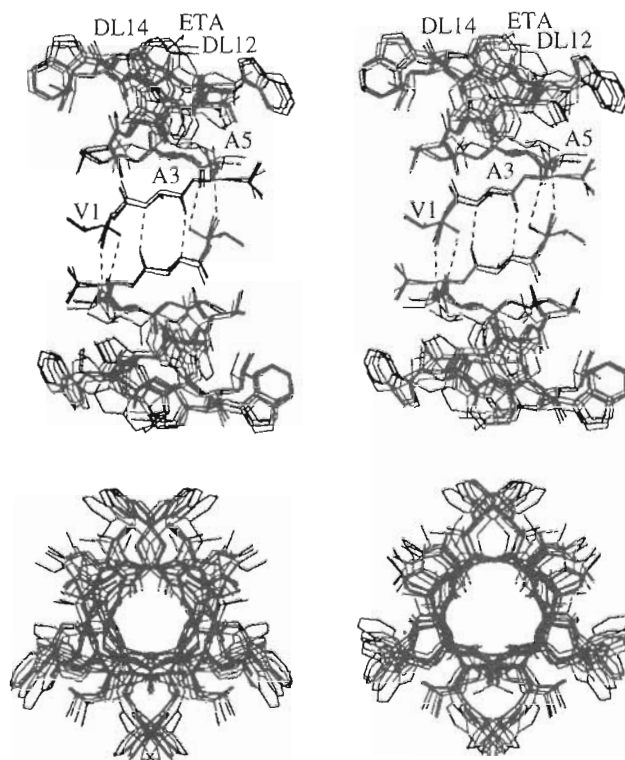


Рис. 12. Стереорепрезентация совмещенных по  $\text{C}^\alpha$ -атомам пяти моделей пространственной структуры трансмембранного ионного канала грамицидина A в мицеллах SDS по данным ЯМР [110, 111]: димер N-конец к N-концу,  $\pi_{L,D}^{6,3}$ -спирали, каждый из мономеров представляет собой правую  $\pi_{L,D}^{6,3}$ -спираль. Пунктиром показаны водородные связи, образованные между мономерами. Приведены две ориентации моделей; DL – *D*-лейцин; ETA – этаноламинная группа.

из 2700 копий небольших белков, содержащих 45 - 50 аминокислотных остатков. В составе капсид эти белки находятся в конформации вытянутой  $\alpha$ -спирали, которая включает 90% всех аминокислотных остатков. При взаимодействии бактериофагов с клеткой-хозяином происходит встраивание белков во внутреннюю бактериальную мембрану, где они образуют трансмембранные  $\alpha$ -спиральные тяжи, не нарушая при этом целостности мембраны и не приводя к гибели клетки [113]. Белки капсид этих бактериофагов имеют сходную структурную организацию и являются удобной моделью для исследования процессов встраивания и транслокации белков через мембрану клетки.

Основной белок капсиды бактериофага M13 содержит 50 аминокислотных остатков. Его гидрофильный 20-членный N-концевой участок положительно заряжен при pH 4.5. При встраивании в мембрану фрагмент 21 - 42 образует трансмембранный тяж в конформации  $\alpha$ -спирали, ориентированный так, что N-конец молекулы

находится в периплазматическом пространстве клетки, а короткий С-концевой участок белка локализуется на цитоплазматической стороне мембраны [17]. При исследовании пространственной структуры этого белка использовались различные детергенты, такие, как DPC, SDS и дезоксихолат натрия, в мицеллах которых белок M13 имеет сходные спектры КД с мембраноассоциированной формой. Однако только в мицеллах SDS ширина линий в спектрах  $^1\text{H}$ - и  $^{15}\text{N}$ -ЯМР белка оказалась приемлемой для исследования его пространственной структуры методами ЯМР [18]. В работе [17] проведены  $^1\text{H}$ - и  $^{15}\text{N}$ -ЯМР-эксперименты на неселективно и селективно (Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Lys и Met)  $^{15}\text{N}$ -меченном M13, солюбилизованном в мицеллах SDS в соотношении 2 молекулы белка на мицеллу. Показано, что в мицеллах SDS белок находится в виде несимметричного димера, мономеры которого образуют  $\alpha$ -спирали на участках 20 - 23 и 24 - 42.  $\alpha$ -Спираль на участке 20 - 23 менее стабильна по сравнению с протяженной  $\alpha$ -спиралью участка 24 - 42, на котором происходит взаимодействие мономеров. Длина  $\alpha$ -спирали, соответствующей трансмембранному участку белка M13, оказывается на три остатка короче его гидрофобной аминокислотной последовательности, что можно связать с тем, что диаметр мицеллы SDS меньше, чем толщина внутренней мембраны *E. coli*. Некоторые различия в конформациях мономеров позволили идентифицировать сигналы в спектрах ЯМР, относящиеся к индивидуальным мономерам, медленно (в шкале времен ЯМР) обменивающиеся между собой. В спектрах NOESY не обнаружено кросс-пиков, соответствующих ЯЭО-контактам между мономерами, что не позволило определить ориентацию мономеров друг относительно друга. Однако наблюдающиеся различия в химических сдвигах сигналов  $^1\text{H}$  и  $^{15}\text{N}$  индивидуальных мономеров на участке 22 - 48 авторы объясняют взаимодействием между параллельно ориентированными протяженными  $\alpha$ -спиралями участка 24 - 42.

Используя данные спектроскопии  $^1\text{H}$ -ЯМР, авторы работы [19] предложили аналогичную белку M13 модель для белка оболочки родственного филаментного бактериофага Pf1 (46 аминокислотных остатков), встроенного в мицеллы DPC. Вторичная структура белка Pf1 представляет собой две  $\alpha$ -спирали на участках 6 - 13 и 19 - 42, соединенных короткой петлей с достаточно фиксированной конформацией. В отличие от белка бактериофага M13 белок капсида Pf1 имеет в мицеллах DPC мономерную организацию. Эксперименты с использованием методов ЯМР твердого тела для белка Pf1, реконструированного в фосфолипидном бислое, показали, что N-концевая  $\alpha$ -спираль располагается на поверхности бислоя, причем ее ось ориентирована параллельно по-

верхности [19]. Относительные ориентации спиралей в белках M13 и Pf1, солюбилизованных в мицеллах детергентов, остаются неизвестными, однако данные ЯМР твердого тела указывают на то, что N-концевая  $\alpha$ -спираль этих белков располагается на поверхности мицеллы [17]. Эта  $\alpha$ -спираль может выполнять функции своеобразного якоря, фиксируя положение трансмембранного тяжа в мембране.

Для того чтобы исследовать стабильность  $\alpha$ -спиральной конформации трансмембранного участка белка капсида фага Pf1 при транслокации его из состава капсида во внутреннюю мембрану *E. coli*, в работе [113] оболочка Pf1 подвергалась солюбилизации детергентом SDS в  $^2\text{H}_2\text{O}$ . При этом следили за скоростью обмена протонов индивидуальных амидных групп белка, отнесение сигналов  $^1\text{H}$ - и  $^{15}\text{N}$ -ЯМР для которых выполнено в работе [114], на дейтерий растворителя. Если встраивание Pf1 в мицеллы детергента происходит через стадию потери вторичной структуры, то к моменту получения первого спектра  $^1\text{H}$ -ЯМР все амидные протоны пептида должны быть обменены на дейтерий растворителя. Однако, как показал эксперимент, при встраивании в мицеллу на участке 30 - 40 обмен амидных протонов значительно замедлен по сравнению с остальными участками молекулы, что свидетельствует о сохранении, по крайней мере на этом участке, конформации  $\alpha$ -спирали при разрушении капсида и встраивании белков оболочки в мембрану клетки.

### II.3. Интегральные мембранные белки

В отличие от связывающихся с мембраной гормонов и нейропептидов, вторичная структура которых является главным фактором, определяющим характеристики связывания с мембранными рецепторами [37], для трансмембранных ионных каналов, рецепторов и других интегральных мембранных белков определяющее функциональное значение имеет третичная и четвертичная структура.

Одним из наиболее эффективных методов исследования пространственной структуры белков с массой больше 30 кДа оказалась гетероядерная ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) многомерная спектроскопия ЯМР [32, 115]. Однако нерастворимость в водных буферах и тенденция к агрегации, обусловленные высокой гидрофобностью мембранных белков, стали причиной значительного уширения сигналов в спектрах ЯМР. Один из возможных путей решения этой проблемы – подбор искусственной среды, сохраняющей структуру молекулы и позволяющей получить спектры ЯМР высокого разрешения. С другой стороны, перспективным подходом к анализу пространственной организации крупных мембранных белков может стать расщепление их полипептидной цепи на части

или синтез отдельных структурно значимых фрагментов белка и их исследование методом ЯМР в модельных системах с последующей реконструкцией структуры всей молекулы. Естественно, что этот подход оправдан лишь в том случае, когда есть свидетельства сохранения у фрагментов конформации, присущей им в составе целой молекулы, а также сохранения структуры при переходе в искусственную среду. Для получения таких свидетельств используют методы оптической спектроскопии.

К настоящему времени известно всего два примера применения спектроскопии ЯМР высокого разрешения для исследования пространственной структуры интегральных мембранных белков или их комплексов. Это субъединица  $H^+$ -АТФ-азы и бактериородопсин.

**$H^+$ -АТФ-аза.** Важнейшую роль в клетке играют мембранные системы активного (т.е. энергозависимого) транспорта ионов против градиента их электрохимического потенциала, использующие для процесса транслокации энергию гидролиза АТФ. Обратимая протонтранслоцирующая АТФ-аза, или  $H^+$ -АТФ-аза, катализирует последний этап окислительного и фотосинтетического фосфорилирования в митохондриях, хлоропластах и бактериях.  $H^+$ -АТФ-азы, выделенные из различных эукариотических и бактериальных клеток, представляют собой сложные мембраносвязанные комплексы с молекулярной массой 450 - 500 кДа и имеют сходную структурную организацию [116]. Молекулы этих ферментов состоят из двух частей: водорастворимой каталитической части (F1), которая вне мембраны может функционировать только как АТФ-аза, но не как АТФ-синтетаза, и мембранной части (F0), обладающей протонтранслоцирующей активностью. Обе части имеют сложный субъединичный состав. Только полный F1F0-комплекс способен осуществлять реакцию преобразования энергии. Субъединица F1 *E. coli*, в свою очередь, состоит из пяти типов субъединиц ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ), а F0 из трех (*a*, *b*, *c*) при стехиометрии  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$  для F1 и  $a_1b_2c_{10}$  для F0. Субъединица *b* мембранного домена F0 формирует на мембране центр связывания F1 и, вероятно, совместно с субъединицей *c* участвует в образовании протонпроводящего пути в сопрягающей мембране. Функциональная роль субъединицы *a* остается невыясненной. Наиболее изучена субъединица *c*, называемая также протеолипидом из-за ее растворимости в органических растворителях, мицеллах и везикулах липидов [116]. Встраивание субъединицы *c* в фосфолипидные везикулы после экстракции ее из состава F1F0-комплекса органическими растворителями приводит к образованию трансмембранных каналов, способных транслоцировать протон по градиенту pH. Связывание  $N,N'$ -дициклогексилкарбодиимида с субъединицей *c* блокирует транслокацию прото-

нов и ингибирует как синтез, так и гидролиз АТФ F1F0-комплексом [116].

Аминокислотная последовательность протеолипида содержит 79 остатков, формирующих два сильногидрофобных участка. Поскольку спектры КД протеолипида в мицеллах DMPC, мицеллах SDS, смеси хлороформ-метанол (1 : 1) и в трифторэтаноле оказались сходными [117], два последних органических растворителя выбраны в качестве среды для солюбилизации при исследовании пространственной структуры протеолипида методами ЯМР. В работе [118] проведено отнесение сигналов  $^{15}N$  и  $^1H$   $^{15}N$ -меченого протеолипида в трифторэтаноле и установлена его вторичная структура, содержащая две  $\alpha$ -спирали (остатки 10 - 40 и 48 - 77), соединенные подвижным 8-членным участком. Остаток Pro64, так же как и заряженный Asp61, являющийся специфическим сайтом связывания  $N,N'$ -дициклогексилкарбодиимида, не вызывает нарушений хода второй  $\alpha$ -спирали. При измерении гетероядерного [ $^{15}N$ - $^1H$ ] эффекта Оверхаузера для протеолипида обнаружено уменьшение внутримолекулярной подвижности амидных групп на  $\alpha$ -спиральных участках. Значения  $\rho_K$  измерены для пяти карбоксильных групп боковых цепей аспарагиновых и глутаминовых кислот и показано, что они значительно отличаются от соответствующих величин для свободных аминокислот в трифторэтаноле. Этот факт объясняется влиянием гидрофобного окружения, возникающего при взаимной упаковке  $\alpha$ -спиральных участков. Однако в спектрах NOESY не были обнаружены кросс-пики ЯЭО, соответствующие контактам между спиралями.  $\rho_K$  5.3 титрующей группы Asp61, протонирующей и депротонирующей в процессе транслокации протона через мембрану, на единицу выше  $\rho_K$  для этой группы свободной аминокислоты. Это, а также повышенная подвижность основной цепи  $\alpha$ -спирали в районе Pro64 могут играть важную роль в процессе транслокации протона, молекулярный механизм которого еще не установлен.

В смеси хлороформ-метанол (1 : 1) [117] удалось провести отнесение сигналов в спектрах  $^1H$ -ЯМР к определенным типам аминокислотных остатков протеолипида. Однако в спектрах NOESY только для нескольких аминокислотных остатков, находящихся на С-концевом участке 67 - 79 протеолипида, наблюдались кросс-пики ЯЭО, соответствующие межостаточным контактам и позволяющие отнести остаток к определенному положению в аминокислотной последовательности. Исследуя зависимости положения сигналов в спектрах  $^1H$ -ЯМР от pH, удалось отнести сигналы титрующихся остатков Asp и Glu, а также нескольких соседних остатков. Для карбоксильной группы Asp61 наблюдалось аномально высокое значение  $\rho_K$  5.5. Авторы работы [117] предполагают, что

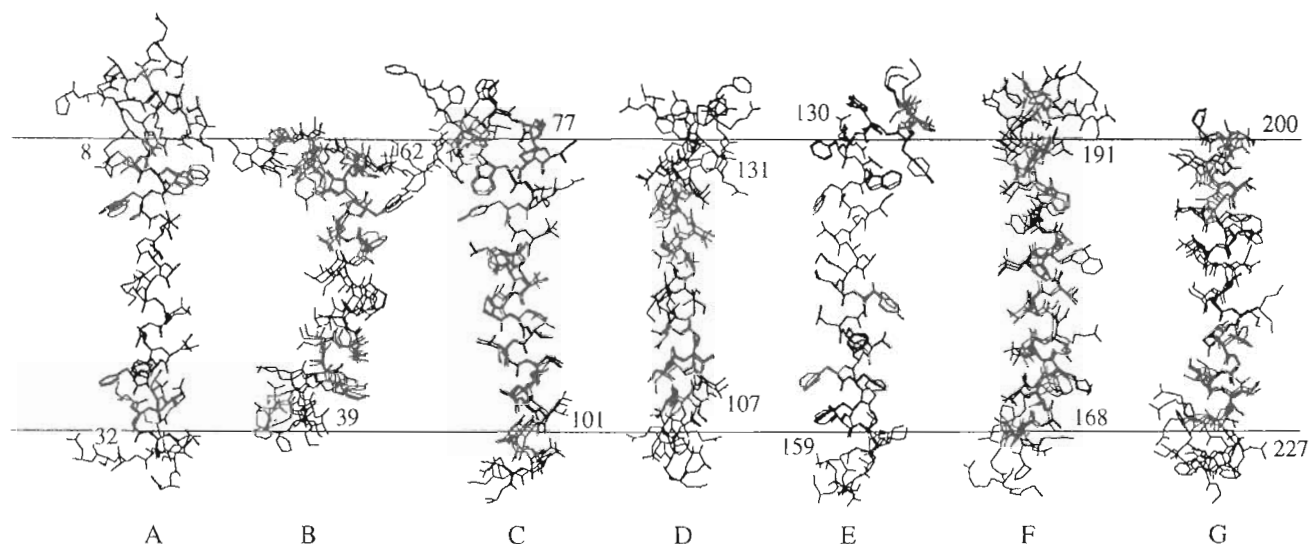


Рис. 13. Изображение совмещенных по  $C^{\alpha}$ -атомам моделей пространственной структуры трансмембранных сегментов А - G бактериоропсина, реконструированных по данным ЯМР [142 - 148].

в смеси хлороформ-метанол протеолипид находится в виде агрегатов, однако, судя по ширине линий в спектре  $^1H$ -ЯМР, их молекулярная масса не превосходит 25 кДа, т.е. агрегаты состоят не более чем из 4 молекул протеолипида. Использование мицелл детергентов позволило бы более детально изучить влияние границы раздела фаз на структуру С-концевого участка протеолипида, играющего решающую роль в процессе транслокации протонов через клеточную мембрану.

**Бактериородопсин.** Наиболее детально изученным интегральным мембранным белком является бактериородопсин (БР) из *Halobacterium halobium*, молекула которого содержит 248 аминокислотных остатков, а также хромофорную группу (ретиаль), связанную основанием Шиффа с  $\epsilon$ -аминогруппой группой Lys216 [119, 120]. Поглощение бактериородопсином кванта света приводит к выбросу из клетки протона, что в конечном итоге создает электрохимический градиент в клеточной мембране, достигающий 300 мВ. В пурпурных мембранах тримеры молекул бактериородопсина образуют двумерные кристаллы с гексагональной упаковкой. Применение электронной криомикроскопии позволило установить упаковку молекул в пурпурных мембранах, а также построить модель пространственной структуры, основываясь на картах электронной плотности с разрешением 0.3 и 1.0 нм в параллельном и перпендикулярном направлениях к плоскости мембраны соответственно [5]. Каждая молекула состоит из семи пронизывающих мембрану сегментов, имеющих конформацию  $\alpha$ -спирали (рис. 13).

Связанный с мембраной БР имеет очень широкие сигналы в спектрах ЯМР, поэтому требуется подбор искусственной среды, моделирующей мем-

бранное окружение бактериородопсина. Для сольubilизации БР используются детергенты и органические растворители. Выбор детергента определяется в первую очередь степенью сохранения нативной структуры белка. При ЯМР-исследованиях важны также три параметра, влияющие на время корреляции: размер комплекса белок-детергент, максимальная температура, при которой белок сохраняет структуру, и вязкость среды.

Смешанные липид-детергентные мицеллы, исследованные в работе [121], хорошо моделируют мембранное окружение БР, однако они имеют довольно большую массу (около 210 кДа) и, следовательно, большое время корреляции. Поэтому для получения в спектрах ЯМР достаточно высокого разрешения предпочтительнее использовать мицеллы, не содержащие липида.

Известно, что БР в растворах детергента Triton X-100 находится в виде мономеров и сохраняет ряд спектральных и функциональных свойств нативного пигмента [122 - 124]. Однако при исследовании методом спектроскопии  $^{19}F$ -ЯМР трифторацетилированного БР, сольubilизованного в этом детергенте, оказалось, что сигналы в спектрах сильно уширены, вероятно, вследствие больших размеров детергент-белкового комплекса [125]. Это обстоятельство привело к выводу о нецелесообразности использования растворов детергента Triton X-100 в качестве модельной системы.

Методом спектроскопии  $^{13}C$ -ЯМР исследована сольubilизация  $[1-^{13}C]Phe$ -меченого БР в четырех детергентах: Triton X-100, октилтиоглюкопиранозиде (OTG), *n*-додецилмальтозиде (DM) и смеси OTG-DM (2 : 1) [126]. Среди рассмотренных детергентов наиболее предпочтителен, по мнению авторов работы [126], DM, в котором БР

находится в виде мономера и сохраняет все спектральные и функциональные характеристики интактного состояния.  $^1\text{H}$ -,  $^{15}\text{N}$ -ЯМР-эксперименты на неселективно и селективно  $^{15}\text{N}$ -меченном БР, солюбилизованном в мицеллах DM [127], показали, что из ожидавшихся 256 кросс-пиков в двумерном спектре корреляции химических сдвигов сигналов  $^1\text{H}$  и  $^{15}\text{N}$  присутствуют только приблизительно 110, т.е. около 40%. Таким образом, установлено, что в состоянии, близком к нативному, БР испытывает сложное внутримолекулярное движение, которое приводит к уширению сигналов в спектрах  $^1\text{H}$ - и  $^{15}\text{N}$ -ЯМР. Авторам не удалось провести отнесение сигналов и локализовать области повышенной конформационной подвижности, как это сделано в работе [115].

В работе [128] методом  $^{13}\text{C}$ -ЯМР исследовали БР с биосинтетически меченным [метил- $^{13}\text{C}$ ]метионином, солюбилизованный в детергенте Triton X-100. В полученных спектрах девять остатков метионина давали четыре хорошо разрешенные линии, две из которых удалены от центральной группы сигналов в сильное и слабое поля. Два центральных сигнала соответствуют по интегральной интенсивности четырем и одному остаткам. Их химические сдвиги (15.4 и 14.9 м. д.) близки к величине химического сдвига сигнала ядра  $^{13}\text{C}^e$  свободного метионина (15.04 м. д.). Смещение сигналов в сильное (один остаток) и слабое (три остатка) поля, по мнению авторов работы [128], может быть вызвано влиянием пространственно близких ароматических остатков. Однако не исключена возможность аналогичного влияния кольцевых токов фенильной части молекул Triton X-100, окружающих БР.

При ЯМР-исследованиях гидрофобных пептидов, белков или их фрагментов наиболее распространен, по-видимому, детергент анионной природы – SDS. Известно свойство SDS (при низких его концентрациях) стабилизировать  $\alpha$ -спиральную конформацию [129, 130], что особенно важно для БР, являющегося высокоспиральным мембранным белком. По данным оптической спектроскопии, концентрации SDS меньше 1% не вызывают сильных изменений третичной структуры БР, но при этом разрушаются тримеры БР и уменьшается время корреляции.

Ароматические аминокислотные остатки апо-мембран исследовали методом спектроскопии  $^1\text{H}$ -ЯМР в воде в присутствии 0.1, 0.4 и 1.0% SDS [131]. На фоне широких (порядка 1 кГц) линий спектра выделялись относительно узкие сигналы (< 50 кГц), принадлежащие ароматическим протонам более подвижных остатков. С помощью спектроскопии НОНАНА (2М-гомоядерная спектроскопия Хартмана–Хана) узкие сигналы отнесены к определенным типам аминокислотных остатков и сделан вывод о том, что из 32 ароматических

аминокислотных остатков примерно 9 (3 Trp, 2 Trp и примерно 4 Phe) подвижны. Кроме того, методом фото-ХПЯ обнаружены один триптофан и один тирозин, локализованные вне мембраны [131].

Альтернативой мицеллам может служить растворитель, моделирующий гидрофобное окружение белка в мембране. Для исследования пространственного строения БР методами спектроскопии ЯМР предложена [132, 133] смесь хлороформа и метанола в соотношении 1 : 1 с добавкой 0.1 M  $\text{LiClO}_4$ . С использованием КД- [134] и ИК- [132] спектроскопии показано, что в этой смеси комплекс сохраняет спектральные характеристики, близкие к тем, которые имеет БР в пурпурной мембране и везикулах фосфолипидов. Это указывает на то, что в смеси органических растворителей БР сохраняет нативную вторичную структуру. Чтобы подтвердить наличие в органическом растворителе третичной структуры, получены  $^{19}\text{F}$ -ЯМР-спектры БР, меченного 5-фтортриптофаном, и фрагментов его протеолитического расщепления [133]. Сравнение спектров БР и его фрагментов позволило отнести отдельные сигналы в спектре  $^{19}\text{F}$ -ЯМР. Исследуя влияние титрования и модификации хромофора на химический сдвиг отдельных сигналов, авторы получили данные о внутримолекулярных взаимодействиях в БР, солюбилизованном в смеси хлороформ–метанол (1 : 1), между спиралями А и G, а также между  $\beta$ -иононовым кольцом ретиналя и сегментом E.

В работе [135] в такой же системе растворителей (хлороформ–метанол (1 : 1) с 0.1 M  $\text{LiClO}_4$ ) исследовался БР, меченный 3-фторфенилаланином. Расщепление полипептидной цепи слабо влияло на химические сдвиги сигналов ядер  $^{19}\text{F}$ , за исключением тех случаев, когда остаток 3-фторфенилаланина близок к месту расщепления по аминокислотной последовательности. Это указывает на то, что индивидуальные фрагменты в смеси хлороформ–метанол имеют такую же структуру, как и в составе целой молекулы. С помощью спиновой метки, присоединенной к остатку Met163, показана близость остатков Met163 и Phe230 на расстояние порядка 1.3 нм. Это подтверждает вывод о наличии у БР в использованном растворителе упорядоченной пространственной структуры.

Изомеризация пептидной связи X-Pro (где X – любой аминокислотный остаток) изменяет примерно на 2 м. д. химический сдвиг сигнала от ядра  $^{13}\text{C}^y$  остатков пролина. Для определения конфигурации таких связей в БР получен спектр [ $^{13}\text{C}^y$ ]Pro]БР в смеси хлороформ–метанол (1 : 1) с 0.1 M  $\text{LiClO}_4$ . Найдено, что все 11 остатков пролина имеют *транс*-конфигурацию [136].

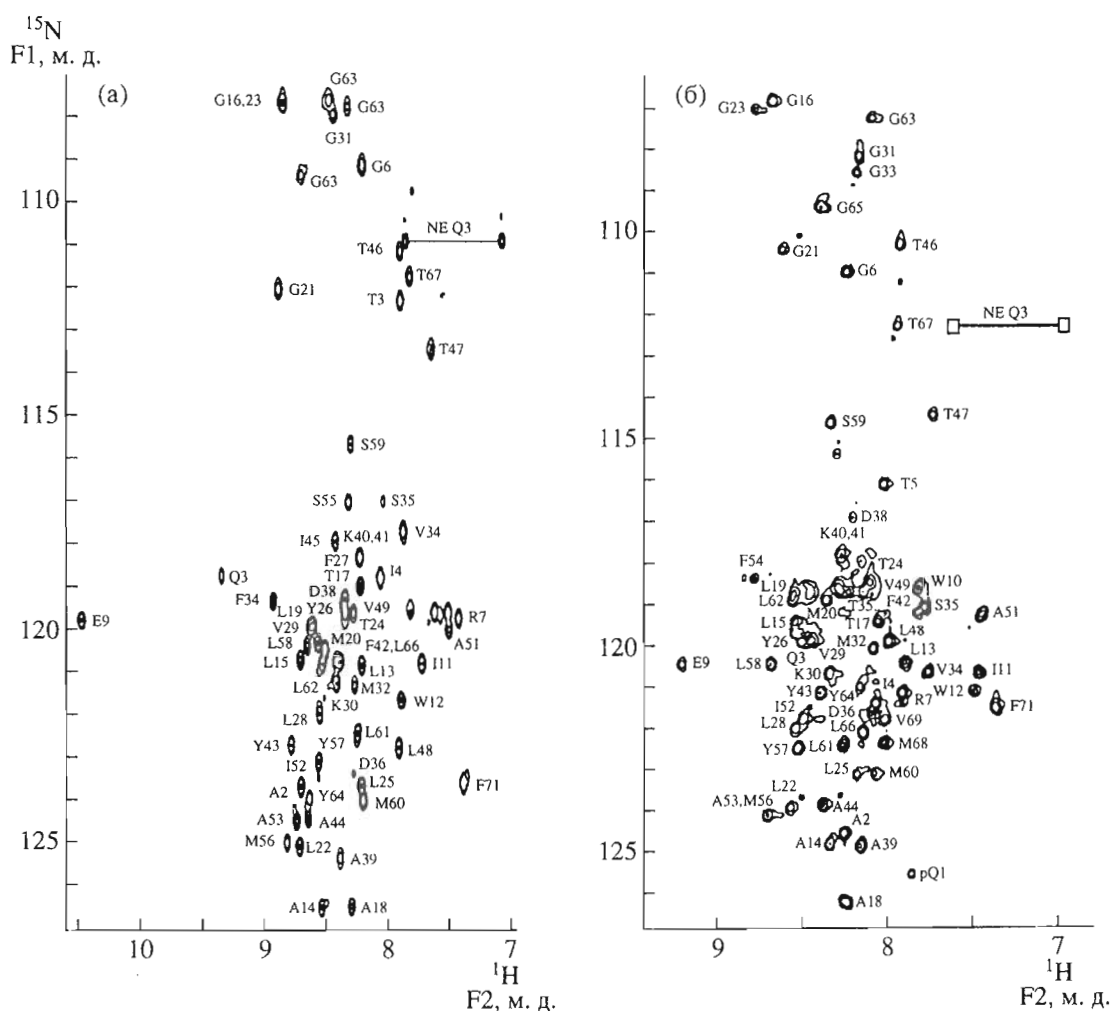
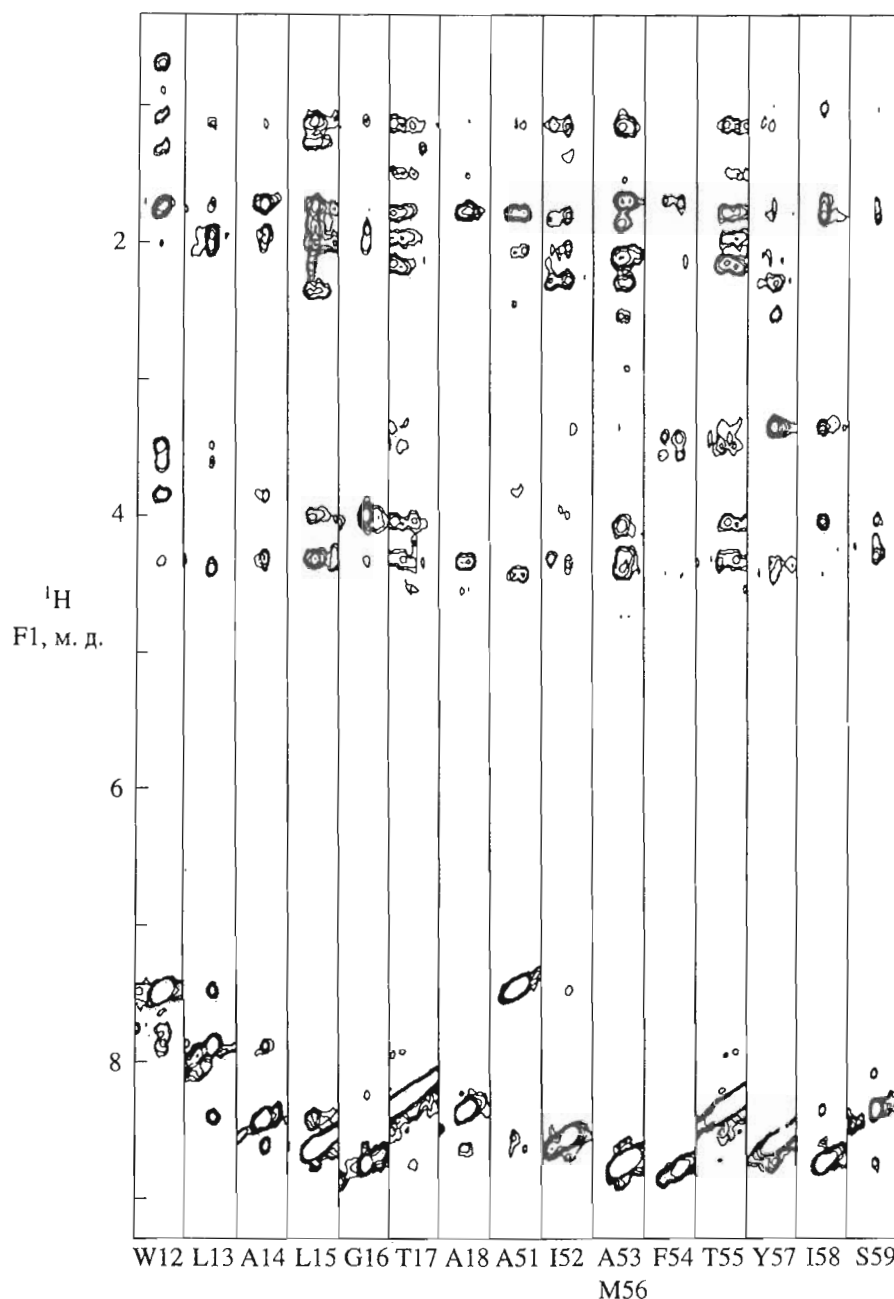


Рис. 14. Спектры HMQC фрагмента C2 (остатки 1 - 71) бактериоопсина: в смеси хлороформ-метанол (1 : 1) с  $\text{HCOONH}_4$  (а) и в мицеллах SDS (б) [138]. На спектрах указано отнесение соответствующих кросс-пиков к аминокислотным остаткам.

Методы спектроскопии ЯМР оказались эффективными при исследовании структуры протеолитических фрагментов C2 (остатки 1 - 71 БР) и ВР2 (остатки 163 - 231 БР), полученных при расщеплении полипептидной цепи бактериородопсина с помощью химотрипсина или  $\text{NaNH}_4$  соответственно в смеси растворителей хлороформ-метанол (1 : 1), моделирующей мембранное окружение, и фрагмента C2 в мицеллах SDS. Вторичная структура химотриптического фрагмента C2 БР установлена [137] на основании анализа ЯЭО и скоростей обмена амидных протонов NH. Для облегчения процедуры последовательного отнесения сигналов в спектрах  $^1\text{H}$ -ЯМР использовался аналог фрагмента C2, в котором остатки лейцина дейтерированы по  $\beta$ -положению. Для  $^{15}\text{N}$ -меченого C2 в мицеллах и органическом растворителе получены также 2М-гетероядерные спектры корреляции химических сдвигов сигналов ядер  $^{15}\text{N}$  и  $^1\text{H}$  (HMQC) (рис. 14), а также трехмерные спектры HMQC-NOESY (рис. 15). Использование спектров

HMQC позволило исследовать влияние трифторэтанола на конформационную динамику C2 в мицеллах. Показано, что, не оказывая существенного влияния на конформацию C2, трифторэтанол приводит к ускорению медленного (миллисекунды) конформационного обмена. Аналогичный эффект оказывает повышение температуры образца (рис. 14).

Фрагмент C2, встроенный в мицеллы SDS в присутствии 25% трифторэтанола, содержал два  $\alpha$ -спиральных участка: Pro8-Met32 и Ala39-Leu62. Остаток Gly63 фрагмента C2 находится в конформации, характерной для левой спирали. Такая конформация Gly63 определяет ориентацию спирали петлевого участка между трансмембранными сегментами В и С. Поскольку в спектрах NOESY отсутствовали кросс-пики, соответствующие контактам между трансмембранными участками C2 как в мицеллах, так и в органическом растворителе, авторы работы [138] реконструировали

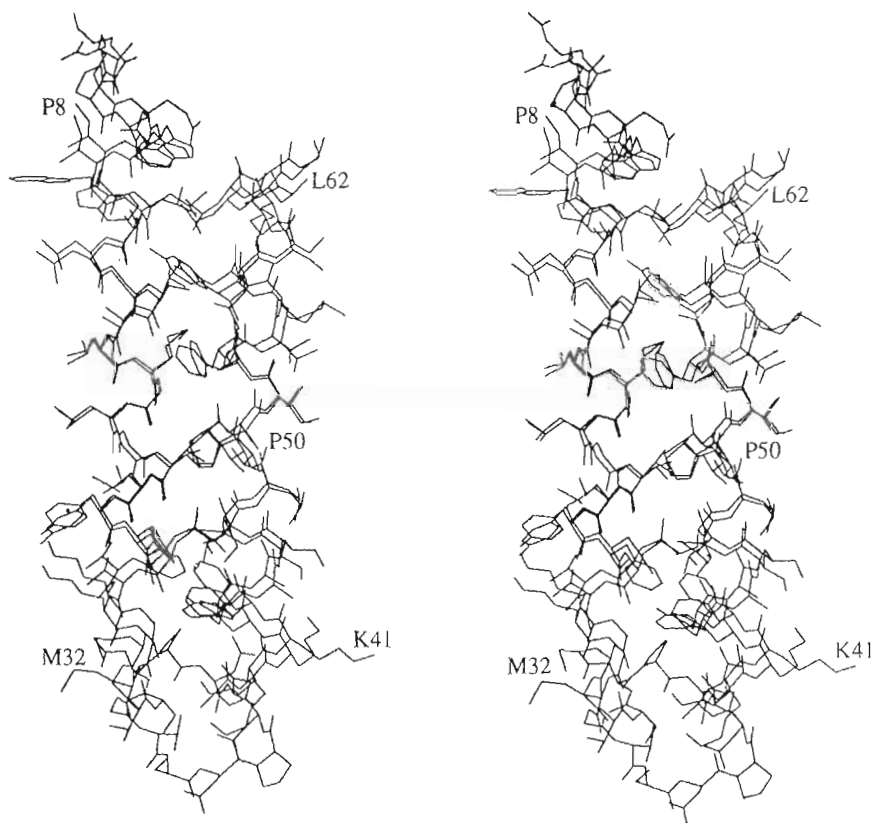


**Рис. 15.**  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -Плоскости спектра NMQC-NOESY  $^{15}\text{N}$ -меченого фрагмента C2 (остатки 1 - 71) бактериопсина, соответствующие химическим сдвигам сигналов ядер  $^{15}\text{N}$  амидных групп остатков Trp12-Ala18 и Ala51-Ser59 в мицеллах SDS [138]. Для удобства представления из каждой  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -плоскости вырезалась область спектра шириной 0.1 м. д., содержащая кросс-пик протона HN-группы соответствующего остатка. Химические сдвиги протонов HN остатков Ala53 и Met56 совпадают.

пространственное строение C2, используя помимо данных ЯМР ограничения на расстояния между  $\text{C}^\alpha$ -атомами соседних спиралей из ЭКМ-модели БР [5] (рис. 16). Сближенность  $\alpha$ -спиралей в гибридной ЯМР-ЭКМ-модели фрагмента C2 не приводила к появлению дополнительных стерических ограничений конформационного пространства боковых цепей  $\alpha$ -спиральных остатков. Использованный подход показывает эффектив-

ность для реконструкции пространственного строения мембранных белков совместного использования данных дифракционных методов, позволяющих получать лишь общую укладку основной цепи мембранных белков, и данных ЯМР о тонких деталях строения отдельных фрагментов.

Исследование внутримолекулярной динамики фрагмента C2 позволило развить общие



**Рис. 16.** Стереорепрезентация двух конформаций участка 7 - 62 фрагмента C2 ЭКМ- и гибридной ЯМР-ЭКМ-моделей бактериородопсина [138]. Конформации совмещены по атомам C $\alpha$ , N, C' и O основной цепи участков Pro8-Met32 и Ala39-Leu62.

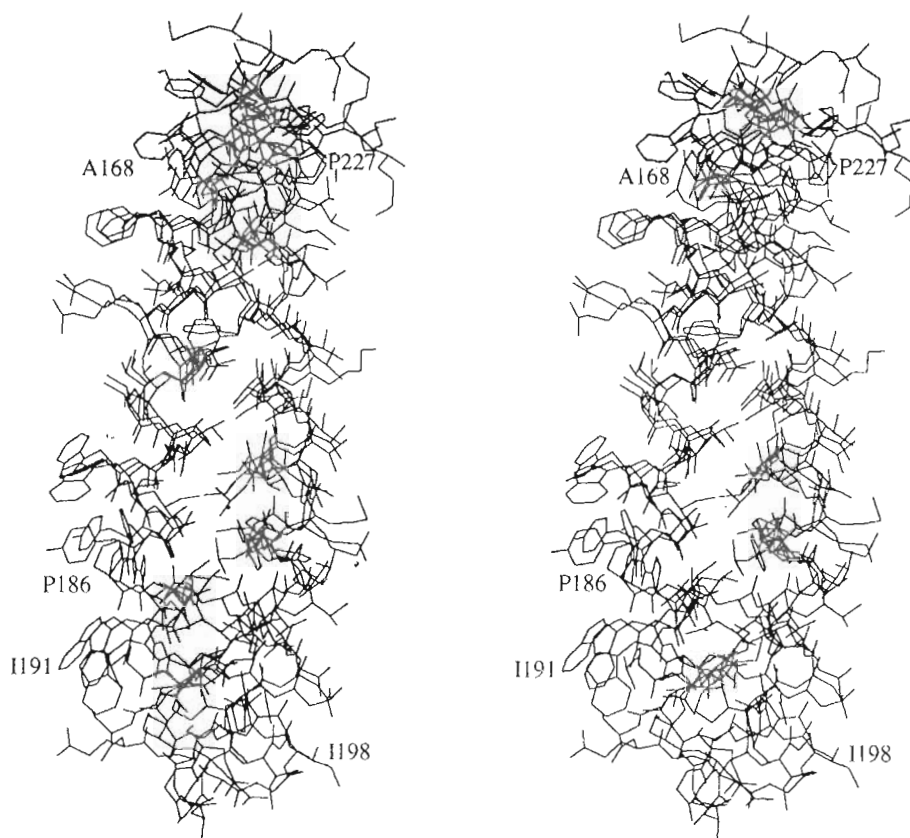
представления о динамике белков в широком диапазоне времен (от пико- до миллисекунд) [139]. Внутримолекулярную динамику фрагмента C2 оказалось возможным разделить на процессы, связанные с внутренней динамикой  $\alpha$ -спиралей, протекающие в пико- и наносекундном диапазоне, и медленные (в масштабе времени ЯМР) кооперативные конформационные перестройки молекулы, обусловленные взаимодействием трансмембранных  $\alpha$ -спиралей. Внутреннюю динамику  $\alpha$ -спиралей можно эффективно исследовать, применяя модельнезависимый подход к интерпретации скоростей релаксации ядер  $^{15}\text{N}$ .

Два  $\alpha$ -спиральных участка, соответствующих трансмембранным сегментам F (остатки 168 - 191) и G (остатки 198 - 227), были идентифицированы [140] на основе контактов ЯЭО и данных о скоростях обмена амидных протонов NH фрагмента BP2, полученных в работе [141]. Сегмент F, содержащий остаток Pro186, имеет излом на угол 25°. Трансмембранные сегменты соединены гибкой перемышкой, образованной остатками Gly192-Gly197. Гибридная ЯМР-ЭКМ-модель BP2 представлена на рис. 17. Для 62% остатков, находящихся на  $\alpha$ -спиральных участках и имеющих боковые цепи, определены торсионные углы  $\chi^1$ . Примерно

у половины остатков сегментов F и G конформации боковых цепей в ЭКМ-модели [5] отличаются от определенных по данным ЯМР-спектроскопии. Авторы [140] объясняют это недостаточным разрешением ЭКМ.

Конформации синтетических пептидов, соответствующих по аминокислотной последовательности фрагментам 34 - 65 [142], 67 - 106 [143], 102 - 136 [144], 128 - 162 [143], 205 - 231 [145] и 190 - 233 [143], исследованы в смеси хлороформ-метанол (1 : 1) с 0.1 M LiClO $_4$ . Конформация фрагментов 1 - 36 и 34 - 65 установлена также в мицеллах SDS [146 - 148]. По данным о межпротонном ЯЭО определены участки пептидов, находящиеся в конформации  $\alpha$ -спиралей, причем наиболее стабильные участки локализованы по низкой скорости обмена на дейтерий растворителя амидных протонов, участвующих в образовании водородных связей типа NH $_{i+4} \cdots$ O=C $_i$ . Полученные результаты суммированы на рис. 13. Локализация участков  $\alpha$ -спиралей бактериородопсина методами  $^1\text{H}$ -ЯМР и ЭКМ практически совпадает, однако по данным  $^1\text{H}$ -ЯМР оказывается возможным не только реконструировать пространственную структуру фрагментов, но и определить предпочтительные ориентации боковых цепей





**Рис. 17.** Стереонизображение трех конформаций фрагмента BP2 (остатки 163 - 231) гибридной ЯМР-ЭКМ-модели бактериородопсина [140]. Конформации совмещены по атомам C $\alpha$ , N, C' и O основной цепи участков Ala168–Ile191 и Ile198–Arg227.

аминокислотных остатков [149]. Эти данные для контактирующих и неконтактирующих участков трансмембранных  $\alpha$ -спиралей позволили авторам работы [138] выдвинуть гипотезу о механизме взаимного “узнавания”  $\alpha$ -спиралей при самосборке мембранных белков. Предполагается, что на этапе образования  $\alpha$ -спиралей при встраивании в мембрану их аминокислотная последовательность гарантирует реализацию единственного ротamera боковой цепи для остатков контактирующих участков [150]. Затем уже сформированные  $\alpha$ -спирали ассоциируют по принципу топологического соответствия поверхностей типа “ключ-замок”, образуя третичную структуру  $\alpha$ -спирально-го мембранного белка.

В работе [115] проведены  $^1\text{H}$ -,  $^{15}\text{N}$ -ЯМР-эксперименты на неселективно и селективно (Trp, Phe, Tyr, Lys, Gly, Leu, Val или Ile)  $^{15}\text{N}$ -меченном БР, солюбилизованном в среде хлороформ–метанол (1 : 1) с 0.1 М  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ . Однако из 249 ожидаемых кросс-пиков в спектре НМРС обнаружено только около 110. Таким образом, в спектре НМРС отсутствует около 60%  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -кросс-пиков, даже если учесть возможное перекрытие сигналов. Это связано с наличием в молекуле про-

цесса, происходящего в промежуточном масштабе времени для химических сдвигов протонов и/или амидных азотов, т.е. в диапазоне 10 мкс – 1 мс. Скорость этого процесса мало зависит от условий эксперимента [115]. По полученным данным выделены две области молекулы БР. В первой, включающей спирали А, В и G, обнаружены кросс-пики  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  от всех селективно  $^{15}\text{N}$ -меченных остатков. Вторая область включает в себя трансмембранные спирали С, D, E, F и соединяющие их петли. Конформационная динамика в этой области приводит к уширению и исчезновению кросс-пиков  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  в спектрах НМРС БР и частично в спектрах фрагмента С1 (остатки 77 - 248).

При функционировании молекула БР испытывает значительные конформационные перестройки, при которых, возможно, происходит некоторое изменение взаимной ориентации или угла наклона трансмембранных  $\alpha$ -спиральных сегментов по отношению к плоскости мембраны [151]. Исследования БР и его фрагментов в мицеллах DM методами ЯМР показали [127], что в состоянии, близком к нативному, БР испытывает внутримолекулярное движение в миллисекундном временном диапазоне, которое приводит к уширению

значительной части сигналов в спектрах  $^1\text{H}$ - и  $^{15}\text{N}$ -ЯМР. ЯМР-исследование БР в смеси хлороформ-метанол (1 : 1) показало [115], что и в изотропной модельной среде органических растворителей наблюдается аналогичное внутримолекулярное движение, сосредоточенное в структурной связке трансмембранных  $\alpha$ -спиралей сегментов С, D, E и F.

Наличие конформационного обмена, по-видимому, является свойством взаимодействующих трансмембранных  $\alpha$ -спиралей мембранных белков. Так, конформационный обмен между двумя состояниями димера белка оболочки фага M13, основным элементом структуры которого является пара взаимодействующих  $\alpha$ -спиралей, наблюдался в мицеллах SDS [18]. В тех же условиях аналогичный белок оболочки фага Pf1 не образует димеров, и для трансмембранного  $\alpha$ -спирального участка конформационный обмен не наблюдался [19]. Значительное уширение сигналов в спектрах  $^1\text{H}$ - и  $^{15}\text{N}$ -ЯМР, соответствующих области предполагаемого контакта двух  $\alpha$ -спиралей трансмембранной субъединицы с  $\text{H}^+$ -АТФ-азы в органических растворителях и мицеллах SDS, по-видимому, связано с существованием обмена между близкими конформациями [117, 118].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основная трудность, возникающая при ЯМР-исследовании мембранных пептидов и белков, – необходимость подбора искусственной среды, моделирующей мембранное окружение. Наиболее распространенным приемом является использование органических растворителей и мицелл различных детергентов. В тех случаях, когда удастся подобрать адекватную среду солиubilизации, спектроскопия ЯМР позволяет получать уникальную информацию о пространственной структуре и внутримолекулярной динамике белков и пептидов с молекулярной массой до 20 - 30 кДа. При исследовании пространственной структуры БР методами ЯМР оказалось эффективным использование смеси органических растворителей хлороформ-метанол (1 : 1) с добавлением 0.1 М  $\text{LiClO}_4$  или  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ , предотвращающих агрегацию молекул белка. Результаты исследования показали, что в этой смеси органических растворителей белок сохраняет вторичную структуру, присущую нативному состоянию в пурпурной мембране, и обладает специфической третичной структурой.

Мицеллы детергентов оказались наиболее удачной системой, моделирующей мембранное окружение и позволяющей эффективно использовать методы ЯМР высокого разрешения для установления пространственной структуры и динамики водорастворимых мембраноактивных пептидных гормонов и нейропептидов, а также

гидрофобных каналообразующих токсинов и интегральных мембранных белков. Развитие методов гетероядерной многомерной спектроскопии ЯМР позволяет исследовать пространственную структуру и динамику все более сложных мембранных систем.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bernstein F.C., Koetzle T.F., Williams G.J.B., Meyer E.F., Jr., Rodgers J.R., Kennard O., Shimanouchi T., Tasumi M. // *J. Mol. Biol.* 1977. V. 112. P. 535 - 542.
2. Deisenhofer J., Michel H. // *Angew. Chem.* 1989. B. 28. S. 829 - 968.
3. Brisson A., Unwin P.N.T. // *Nature.* 1985. V. 315. P. 474 - 477.
4. Weiss M.S., Wacker T., Weckesser J., Welte W., Schulz G.E. // *FEBS Lett.* 1990. V. 267. P. 268 - 274.
5. Henderson R., Baldwin J.M., Ceska T.A., Zemlin F., Beckmann E., Downing K.H. // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 213. P. 899 - 929.
6. Kuhlbrandt W., Wang D.N. // *Nature.* 1991. V. 350. P. 130 - 136.
7. Milburn M.V., Prive G.G., Milligan D.L., Scott W.G., Yeh J., Jancarik J., Koshland D.E., Jr., Kim S.H. // *Science.* 1991. V. 254. P. 1342 - 1348.
8. Bjorkman P.J., Saper M.A., Samraoui B., Bennett W.S., Strominger J.L., Wiley D.C. // *Nature.* 1987. V. 329. P. 506 - 512.
9. Pattus F. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 1990. V. 2. P. 681 - 690.
10. Parker M.W., Pattus F., Tucker A.D., Tsernoglou D. // *Nature.* 1989. V. 337. P. 93 - 101.
11. Li J., Carrol J., Ellar D.J. // *Nature.* 1991. V. 353. P. 815 - 821.
12. Choe S., Bennett M.J., Fujii G., Curmi M.G., Kantardjiev K.A., Collier R.J., Eisenberg D. // *Nature.* 1992. V. 357. P. 216 - 222.
13. Allured V.S., Collier R.J., Carrol S.F., McKay D.B. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1986. V. 83. P. 1320 - 1324.
14. Langs D.A. // *Science.* 1988. V. 241. P. 188 - 191.
15. Fox R.O., Richards F.M. // *Nature.* 1982. V. 300. P. 325 - 329.
16. Terwilliger T.C., Eisenberg D. // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257. P. 6010 - 6015.
17. Henry G.D., Sykes B.D. // *Biochemistry.* 1992. V. 31. P. 5284 - 5297.
18. O'Neil J.D.J., Sykes B.D. // *Biochemistry.* 1989. V. 28. P. 6736 - 6745.
19. Shon K.J., Kim Y.G., Colnago L.A., Opella S.J. // *Science.* 1991. V. 252. P. 1303 - 1304.
20. Kuhlbrandt W. // *Quart. Rev. Biophys.* 1988. V. 21. P. 420 - 477.
21. Attwood D., Florence A.T. // *Surfactant Systems.* London: Chapman, Hall, 1983.
22. Opella S.J., Stewart P.L. // *Meth. Enzymol.* 1989. V. 176. P. 242 - 275.
23. Haris P.I., Chapman D. // *TIBS.* 1992. V. 17. P. 328 - 333.

24. *Brasseur R.* // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 16120 - 16127.
25. *Karplus M., Petsko G.A.* // Nature. 1990. V. 347. P. 631 - 639.
26. *Tobias D.J., Klein M.L., Opella S.J.* // Biophys. J. 1993. V. 64. P. 670 - 675.
27. *Wuthrich K.* // Science. 1989. V. 243. P. 45 - 50.
28. *Лундин А.Г., Федин Э.И.* Ядерный магнитный резонанс – основы и применения. М.: Наука, 1980.
29. *De Marco A., Luigi P.L., Menegatti E., Zetta L.* // J. Biochem. Biophys. Methods. 1986. V. 12. P. 335 - 347.
30. *Steinmann B., Jackle H., Luigi P.* // Biopolymers. 1986. V. 25. P. 1133 - 1156.
31. *Ernst R.R., Bodenhausen G., Wokaun A.* // Principles of NMR in One, two Dimensions. Oxford: Clarendon Press, 1987.
32. *Clore G.M., Gronenborn A.M.* // Prog. NMR spec. 1991. V. 23. P. 43 - 92.
33. *Hore P.J., Kaptein R.* // Photo-CIDNP of Biological Molecules using CW, TR methods, in NMR spectroscopy / Ed. Levy G.C. Washington, D.C.: ACS, 1982.
34. *Кузнецов А.Н.* Метод спинового зонда. М.: Наука, 1977.
35. *Schwyzler R.* // Biochemistry. 1986. V. 25. P. 6335 - 6342.
36. *Hicks R.P., Beard D.J., Young J.K.* // Biopolymers. 1992. V. 32. P. 85 - 96.
37. *Kaiser E.T., Kezdy F.J.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. P. 1137 - 1143.
38. *Ikura T., Go N., Inagaki F.* // Proteins: Struct. Funct. Genet. 1991. V. 9. P. 81 - 89.
39. *Picone D., D'Ursi A., Motta A., Tancredi T., Temussi P.A.* // Eur. J. Biochem. 1990. V. 192. P. 433 - 439.
40. *Zetta L., Hore P.J., Kaptein R.* // Eur. J. Biochem. 1983. V. 134. P. 371 - 376.
41. *Miyazawa T., Higashijima T., Milon A.* // Biochemistry. 1990. V. 29. P. 65 - 75.
42. *Kallick D.A.* // J. Am. Chem. Soc. 1993. V. 115. P. 9317 - 9318.
43. *Chang N.J., Kaler E.W.* // J. Phys. Chem. 1985. V. 89. P. 2996 - 3000.
44. *Tanford C.* The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles, Biological Membranes. N.Y.: John Wiley & Sons, 1980. P. 54 - 80.
45. *Deber C.M., Behnam B.A.* // Biopolymers. 1985. V. 24. P. 105 - 116.
46. *Zetta L., De Marco A., Zannoni G.* // Biopolymers. 1986. V. 25. P. 2315 - 2323.
47. *Lancaster C.R.D., Mishra P.K., Hughes D.W., St. Pierre S.A., Bothner-Bu A.A., Ep R.M.* // Biochemistry. 1991. V. 30. P. 4715 - 4726.
48. *Lee S., Russel A.F., Laidig W.D.* // Int. J. Peptide and Protein Res. 1990. V. 35. P. 367 - 377.
49. *Zetta L., Consonni R., De Marco A., Vecchio G., Manera E., Longhi R.* // Biopolymers. 1990. V. 30. P. 899 - 909.
50. *Lichtarge O., Jardetzky O., Choh Hao Li* // Biochemistry. 1987. V. 26. P. 5916 - 5925.
51. *Zetta L., Kaptein R.* // Eur. J. Biochem. 1984. V. 145. P. 181 - 186.
52. *Zetta L., Hore P.J., Kaptein R.* // Eur. J. Biochem. 1983. V. 134. P. 371 - 376.
53. *Xu G.Y., Deber C.M.* // Int. J. Peptide and Protein Res. 1991. V. 37. P. 528 - 535.
54. *Montelione G.T., Wuthrich K., Burgess A.W., Neis E.C., Wagner G., Gibson K.D., Scheraga H.A.* // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 236 - 249.
55. *Kohda D., Inagaki F.* // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 677 - 685.
56. *Mayo K.H., De Marco A., Menegatti E., Kaptein R.* // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 14899 - 14904.
57. *Mierke D.F., Durr H., Kessler H., Jung G.* // Eur. J. Biochem. 1992. V. 206. P. 39 - 48.
58. *Cavatorata P., Szabo G., Farruggia G., Masotti L.* // Biopolymers. 1989. V. 28. P. 441 - 463.
59. *Malikayil J.A., Edwards J.V., McLean L.R.* // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 7043 - 7049.
60. *Morelli M.A.C., Pastore A., Motta A.* // J. Biomol. NMR. 1992. V. 2. P. 335 - 348.
61. *Mammi S., Mammi N.J., Peggion E.* // Biochemistry. 1988. V. 27. P. 1374 - 1379.
62. *Molinari H., Mammi S.* // J. Magn. Reson. 1990. V. 90. P. 355 - 358.
63. *Olejniczac E.T., Gampe R.T., Rockway T.W., Fesik T.* // Biochemistry. 1988. V. 27. P. 7124 - 7131.
64. *Braun W., Wider G., Lee K.H., Wuthrich K.* // J. Mol. Biol. 1983. V. 169. P. 921 - 948.
65. *Clore G.M., Martin S.R., Gronenborn A.M.* // J. Mol. Biol. 1986. V. 191. P. 553 - 561.
66. *Maurer T., Lucke C., Ruterjans H.* // Eur. J. Biochem. 1991. V. 196. P. 135 - 141.
67. *Marion D., Zaslloff M., Bax A.* // FEBS Lett. 1988. V. 227. P. 21 - 26.
68. *Wakamatsu K., Okada A., Miyazawa T., Ohya M., Higashijima T.* // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 5654 - 5660.
69. *Wakamatsu K., Okada A., Miyazawa T., Masui Y., Sakakibara S., Higashijima T.* // Eur. J. Biochem. 1987. V. 163. P. 331 - 338.
70. *Jelicks L.A., Briodo M.S., Becker J.M., Naidier F.R.* // Biochemistry. 1989. V. 28. P. 4233 - 4240.
71. *Woolley G.A., Deber C.M.* // Biopolymers. 1987. V. 26. P. 109 - 121.
72. *Duplaa H., Convert O., Sautereau A.M., Tocanne J.F.* // Biochim. et biophys. acta. 1992. V. 1107. P. 12 - 22.
73. *Овчинников Ю.А., Иванов В.Т., Шкроб А.М.* Мембранно-активные комплексоны. М.: Наука, 1974.
74. *Быстров В.Ф.* // Успехи химии. 1972. Т. 41. С. 512.
75. *Meers P., Feigenson G.W.* // Biochim. et biophys. acta. 1988. V. 938. P. 469 - 482.
76. *Bystrov V.F., Gavrilov Y.D., Ivanov V.T., Ovchinnikov Y.A.* // Eur. J. Biochem. 1977. V. 78. P. 63 - 82.
77. *Katz S.L., Anantharamaiah G.M., Venkatachalapathi Y.V., Segrest J.P., Philips M.C.* // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 12217 - 12223.
78. *Simorre J.P., Genest D., Caille A., Ptak M.* // Eur. Biophys. J. 1990. V. 18. P. 309 - 316.
79. *Pinter T.P., Urry D.W.* // Biochemistry. 1972. V. 11. P. 4132 - 4139.

80. Marion D., Genest M., Caille A., Peypoux F., Ptak M. // *Biopolymers*. 1986. V. 25. P. 153 - 170.
81. Genest M., Marion D., Caille A., Ptak M. // *Eur. J. Biochem.* 1987. V. 169. P. 389 - 398.
82. Macquaire F., Baleux F., Giaccobi E., Huynhdinh T., Neumann J.M., Sanson A. // *Biochemistry*. 1992. V. 31. P. 2576 - 2582.
83. Dekker N., Peters A.R., Slotboom A.J., Boelens R., Kaptein R., Dijkman R., Dehaas G. // *Eur. J. Biochem.* 1991. V. 199. P. 601 - 607.
84. Rule G.S., Pratt E.A., Simplaceanu V., Ho C. // *Biochemistry*. 1987. V. 26. P. 549 - 556.
85. Wakamatsu K., Choung S.Y., Kobayashi T., Inoue K., Higashijima T., Miyazawa T. // *Biochemistry*. 1990. V. 29. P. 113 - 118.
86. Mendz G.L., Moore W.J., Brown L.R., Martenson R.E. // *Biochemistry*. 1984. V. 23. P. 6041 - 6046.
87. Karslake C., Piotto M.E., Pak Y.K., Wiener H., Gorenstein D.G. // *Biochemistry*. 1990. V. 29. P. 9872 - 9878.
88. Yee A.A., O'Neil J.D.J. // *Biochemistry*. 1992. V. 31. P. 3135 - 3143.
89. Kelsh L.P., Ellena J.F., Casifo D.S. // *Biochemistry*. 1992. V. 31. P. 5136 - 5144.
90. Hall J.E., Vodyanoy I., Balasubramanian T.M., Marshall G.R. // *Biophys. J.* 1984. V. 45. P. 233 - 238.
91. Menestrina G., Voges K.P., Jung G., Boheim G. // *J. Membr. Biol.* 1986. V. 93. P. 111 - 117.
92. Lipari G., Szabo A. // *Biochemistry*. 1982. V. 104. P. 4546 - 4559.
93. Clore G.M., Szabo A., Bax A., Kay L., Driscoll P.C., Gronenborn A.M. // *J. Am. Chem. Soc.* 1990. V. 112. P. 4989 - 4991.
94. Rebuffat S., Prigent Y., Auvinguette C., Bodo B. // *Eur. J. Biochem.* 1991. V. 201. P. 661 - 674.
95. Bazzo R., Tapin M.J., Pastore A., Harvey T.S., Carver J.A., Campbell I.D. // *Eur. J. Biochem.* 1988. V. 173. P. 139 - 146.
96. Brown L.R., Braun W., Kumar A., Wuthrich K. // *Biophys. J.* 1982. V. 37. P. 319 - 328.
97. Inagaki F., Shimada I., Kawaguchi K., Hirano M., Terasawa I., Ikura T., Go N. // *Biochemistry*. 1989. V. 28. P. 5985 - 5991.
98. Dempsey C.E. // *Biochemistry*. 1988. V. 27. P. 6893 - 6901.
99. Dempsey C.E. // *Biochemistry*. 1992. V. 31. P. 4705 - 4712.
100. Weaver A.J., Kemple M.D., Brauner J.W., Mendelsohn R., Prendergast F.G. // *Biochemistry*. 1992. V. 31. P. 1301 - 1313.
101. Fitton J.E. // *FEBS Lett.* 1981. V. 130. P. 257 - 260.
102. Havel T., Wuthrich K. // *Bull. Math. Biol.* 1984. V. 46. P. 673 - 698.
103. Lee K.H., Fitton J.E., Wuthrich K. // *Biochim. et biophys. acta.* 1987. V. 911. P. 144 - 153.
104. Tapin M.J., Pastore A., Norton R.S., Freer J.H., Campbell I.D. // *Biochemistry*. 1988. V. 27. P. 1643 - 1647.
105. Bystrov V.F., Arsen'ev A.S., Barsukov I.L., Lomize A.L., Abdulaeva G.V., Sobol A.G., Maslennikov I.V., Golovanov A.P. // *Protein Structure, Engineering / Ed. Jardetsky O. N.Y.: Plenum Press, 1989.*
106. Hawkes G.E., Lian L.Y., Ranall E.W. // *J. Magn. Reson.* 1984. V. 56. P. 539 - 542.
107. Heitz F., Heitz A., Trudelle Y. // *Biophys. Chem.* 1986. V. 24. P. 149 - 160.
108. Hawkes G.E., Lian L.Y., Ranall E.W., Sales K.D., Curzon E.H. // *Eur. J. Biochem.* 1987. V. 166. P. 437 - 445.
109. Langs D.A. // *Science*. 1988. V. 241. P. 188.
110. Ломизе А.Л., Орехов В.Ю., Арсеньев А.С. // *Био-орган. химия*. 1992. Т. 18. С. 182 - 189.
111. Арсеньев А.С., Ломизе А.Л., Барсуков И.Л., Быстров В.Ф. // *Биол. мембраны*. 1986. Т. 3. С. 1077 - 1104.
112. Голованов А.П., Барсуков И.Л., Арсеньев А.С., Быстров В.Ф. // *Биол. мембраны*. 1990. Т. 7. С. 154 - 162.
113. Schiksnis R.A., Bogusky M.J., Opella S.J. // *J. Mol. Biol.* 1988. V. 200. P. 741 - 743.
114. Schiksnis R.A., Bogusky M.J., Tsang P., Opella S.J. // *Biochemistry*. 1987. V. 26. P. 1373 - 1381.
115. Orekhov V.Yu., Abdulaeva G.V., Musina L.Yu., Arsen'ev A.S. // *Eur. J. Biochem.* 1992. V. 210. P. 223 - 229.
116. Fillingame R.H. // *H + ATPase (ATP synthase): Structure, Function, Regulation / Ed. Papa S. et al. Bari (Italy): ICSU Press, 1984. P. 109 - 119.*
117. Moody M.F., Jones P.T., Carver J.A., Boyd J., Campbell I.D. // *J. Mol. Biol.* 1987. V. 193. P. 759 - 774.
118. Campbell I.D. // *Biochemistry*. 1992. V. 31. P. 6285 - 6290.
119. Ovchinnikov Yu.A. // *FEBS Lett.* 1982. V. 148. P. 178 - 191.
120. Stoeckenins W. // *TIBS*. 1985. V. 10. P. 483 - 486.
121. Brouillette C.G., McMichens R.B., Stern L.J., Khorana H.G. // *Proteins: Struct. Funct. Gen.* 1990. V. 5. P. 38 - 46.
122. Dencher N.A., Heyn M.P. // *FEBS Lett.* 1978. V. 96. P. 322 - 326.
123. Roux M., Seigneuret M., Rigaud J.L. // *Biochemistry*. 1988. V. 27. P. 7009 - 7015.
124. Dencher N.A., Heyn M.P. // *FEBS Lett.* 1979. V. 108. P. 307 - 310.
125. Bauer P.J., Dencher N.A., Heyn M.P. // *Biophys. Struct. Mechan.* 1976. V. 2. P. 79 - 92.
126. Seigneuret M., Neumann J.-M., Rigaud J.-L. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. P. 10066 - 10069.
127. Seigneuret M., Levy D., Neumann J.-M. // *Abstract of V-th International Conference on Retinal Proteins, 1992, Dourdan, France.*
128. Seigneuret M., Neumann J.-M., Levy D., Rigaud J.-L. // *Biochemistry*. 1991. V. 30. P. 3885 - 3892.
129. Wu Ch.-Sh.C., Yang J.T. // *Biochemistry*. 1980. V. 19. P. 2117 - 2122.
130. Steel J.C.H., Reynolds J.A., Jr. // *J. Biol. Chem.* 1979. V. 254. P. 1633 - 1638.
131. Mayo K.H., Schussheim A., Vuister G.W., Boelens R., Kaptein R., Engelhard M., Hess B. // *FEBS Lett.* 1988. V. 235. P. 163 - 168.
132. Абдулаева Г.В., Сычев С.В., Цетлин В.И. // *Биол. мембраны*. 1987. Т. 4. С. 1254 - 1268.

133. Arsen'ev A.S., Kuriatov A.B., Tsetlin V.I., Byistrov V.F., Ivanov V.T., Ovchinnikov Yu.A. // FEBS Lett. 1987. V. 213. P. 283 - 288.
134. Torres J., Padros E. // FEBS Lett. 1993. V. 318. P. 77 - 79.
135. Абдулаева Г.В., Соболев А.Г., Арсеньев А.С., Цетлин В.И., Быстров В.Ф. // Биол. мембраны. 1991. Т. 8. С. 30 - 43.
136. McDermott A.E., Thompson L.K., Winkel C., Farrar M.R., Pelletier S., Lugtenburg J., Herzfeld J., Griffin R.G. // Biochemistry. 1991. V. 30. P. 8366 - 8371.
137. Sobol A.G., Arsen'ev A.S., Abdulaeva G.V., Musina L.Yu., Byistrov V.F. // J. Biomol. NMR. 1992. V. 2. P. 161 - 171.
138. Pervushin K.V., Orekhov V.Yu., Popov A.I., Musina L.Yu., Arsen'ev A.S. // Eur. J. Biochem. 1993. V. 219. P. 571 - 583.
139. Orekhov V.Yu., Pervushin K.V., Arsen'ev A.S. // Eur. J. Biochem. 1993. V. 219. P. 887 - 896.
140. Barsukov I.L., Nolde D.E., Lomize A.L., Arsen'ev A.S. // Eur. J. Biochem. 1992. V. 206. P. 665 - 672.
141. Barsukov I.L., Abdulaeva G.V., Arsen'ev A.S., Byistrov V.F. // Eur. J. Biochem. 1990. V. 192. P. 321 - 327.
142. Arsen'ev A.S., Maslennikov I.V., Byistrov V.F., Kozhich A.T., Ivanov V.T., Ovchinnikov Yu.A. // FEBS Lett. 1988. V. 231. P. 81 - 88.
143. Арсеньев А.С., Масленников И.В., Кожич А.Т., Быстров В.Ф., Иванов В.Т. // Биоорганическая химия. 1993. Т. 19. С. 5 - 20.
144. Масленников И.В., Арсеньев А.С., Чикин Л.Д., Кожич А.Т., Быстров В.Ф., Иванов В.Т. // Биол. мембраны. 1991. Т. 8. С. 156 - 160.
145. Масленников И.В., Арсеньев А.С., Кожич А.Т., Быстров В.Ф., Иванов В.Т. // Биол. мембраны. 1990. Т. 7. С. 222 - 229.
146. Pervushin K.V., Arsen'ev A.S. // FEBS Lett. 1992. V. 308. P. 190 - 196.
147. Pervushin K.V., Arsen'ev A.S., Kozhich A.T., Ivanov V.T. // J. Biomol. NMR. 1991. V. 1. P. 313 - 322.
148. Lomize A.L., Pervushin K.V., Arsen'ev A.S. // J. Biomol. NMR. 1992. V. 2. P. 361 - 372.
149. Масленников И.В., Ломизе А.Л., Арсеньев А.С. // Биоорганическая химия. 1991. Т. 17. С. 1456 - 1469.
150. Popot J.L., Vitry C., Atteia A. // Membrane Protein Structure: Experimental Approaches / Ed. White S.H. Oxford: University Press, 1993.
151. Draheim J.L., Gibson N.J., Cassim J.Y. // Biophys. J. 1991. V. 60. P. 89 - 100.
152. Dijkstra B.W., Renetseder R., Kalk K.H., Hol W.G.J., Drenth J. // J. Mol. Biol. 1983. V. 168. P. 163 - 171.

## Advances of the NMR Spectroscopy in the Spatial Structure Determination of Membrane Associated Peptides and Proteins

K. V. Pervushin and A. S. Arsen'ev

*Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow*

**Abstract** – The review covers the field of the spatial structure determination of membrane – associated peptides and proteins by the High-Resolution NMR Spectroscopy. The membrane – bound conformations of several hormones, neuropeptides, lipopeptides, peptide antibiotics, bacteriophage coat proteins, transmembrane domains of receptors and others are considered. To mimic the biomembrane environment the appropriate artificial media (organic solvents, micelles of detergents of lipid vesicles) must be adjusted. In that case NMR spectroscopy is a powerful tool for the spatial structure and dynamics investigations of membrane associated peptides and proteins constituting the bases for unraveling of their structure-function relationships.

*Key words:* NMR spectroscopy, membrane proteins, spatial structure, vesicles, micelles.