

Определение трехмерной структуры слабо ориентированных биомолекул методом спектроскопии ЯМР

А.А.Шахатуни, А.Г.Шахатуни

Центр исследования строения молекул Национальной академии наук Республики Армения
375014 Ереван, просп. Азатутян, 26, Республика Армения, факс (3741) 28–1380

Рассмотрены основные достижения и возможности спектроскопии ЯМР слабо ориентированных биомолекул. Благодаря слабому ориентированию удается определить ряд параметров ЯМР, зависящих от ориентации биомолекул, которые в обычных изотропных средах усредняются до нуля. Добавление новых ориентационных ограничений в стандартные процедуры определения трехмерной структуры существенно повышает достигаемую точность. Обсуждены возможности установления структуры биомолекул на основе лишь ориентационно-зависимых параметров, без привлечения других данных ЯМР. Систематизированы способы ориентирования, техника эксперимента, методы расчета; проанализированы основные полученные результаты и перспективы применения спектроскопии ЯМР слабо ориентированных систем при изучении разных классов биомолекул, а также при решении различных задач молекулярной биологии. Приведены примеры биомолекул, структуры которых определены с использованием ориентационно-зависимых параметров.

Библиография — 508 ссылок.

Оглавление

I. Введение	1132
II. Методы исследования структуры неориентированных биомолекул в растворе	1134
III. Изучение мембранных белков методами спектроскопии ЯМР твердого тела	1136
IV. Способы ориентирования биомолекул в растворе	1138
V. Измерение ориентационно-зависимых параметров	1145
VI. Стратегия определения структуры слабо ориентированных биомолекул методами спектроскопии ЯМР	1149
VII. Применение спектроскопии ЯМР для исследования структуры биомолекул	1155
VIII. Заключение	1161
IX. Приложение	1161

I. Введение

Успехи, достигнутые при реализации программы расшифровки генома человека, обозначили новый этап в исследованиях строения и функционирования живых организмов. Изучение генома человека повлекло за собой изучение геномов огромного числа других организмов. Уже установлены первичные структуры многих биомолекул, однако для понимания механизмов функционирования таких молекул необходимо знать их пространственное строение.

Основными методами экспериментального определения трехмерной структуры биомолекул являются рентгеноструктурный анализ (РСА) и спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

В настоящее время в базе данных белков PDB (Protein Data Bank)¹ хранятся результаты структурных исследований ~19 000 белков и их комплексов, однако различны только ~6000 структур, из них лишь ~1000 имеют существенно разную гомологию. Предстоит же определить трехмерные структуры еще огромного числа белков.

К концу 2002 г. ~83% структур биомолекул определено методом РСА, ~16% — методом ЯМР, ~1% — другими методами (в основном методом нейтронографии). Доля структур, установленных с помощью ЯМР, неуклонно возрастает: к концу 1997 г. с помощью ЯМР было определено 1008 структур разных биомолекул, в следующие четыре года их число удвоилось, а концу 2002 г. — утроилось, причем для ~75% из этих биомолекул в PDB не было данных о кристаллической структуре.² Особенно эффективным оказался метод ЯМР для исследования нуклеиновых кислот. С его помощью определено более трети всех структур ДНК и 60% структур РНК.

Сравнение множества структурных данных, полученных методами ЯМР и РСА, показало высокую степень их соответствия, и это свидетельствует о том, что метод ЯМР — достойный «напарник» РСА, хотя доминирующим методом определения пространственной структуры биомолекул остается РСА. Однако многие белки (например, большинство мембранных белков) не удается закристаллизовать, поэтому к ним данный метод неприменим. Кроме того, чтобы вы-

А.А.Шахатуни. Аспирант ЦИСМ НАН РА.

E-mail: astra@msrc.am

А.Г.Шахатуни. Кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник того же центра. Телефон: (3741) 28–7423, e-mail: alexsh@msrc.am

Область научных интересов авторов: спектроскопия ЯМР, строение молекул.

явить роль белков в различных процессах, необходимо знать не только их структуры, но и динамику, причем в условиях, максимально приближенных к среде (жидкой или жидкокристаллической (ЖК)), в которой находятся белки, а также структуры и динамику их партнеров и комплексов. В первую очередь это относится к таким процессам, как ферментативный катализ, иммунный отклик, прохождение сигналов, регуляция белкового синтеза и др. Используя спектроскопию ЯМР, можно решить эти задачи, в то время как метод РСА не всегда для этого подходит.^{3,4}

Несмотря на то что методы спектроскопии ЯМР и РСА основаны на принципиально разных физических явлениях, они имеют много общего: во-первых, объекты изучения; во-вторых, вычислительные программы, позволяющие проводить расчеты с включением данных как РСА, так и ЯМР; в-третьих, базы данных, в которых аккумулируется, архивируется и аннотируется полученная структурная информация о биомолекулах. Поэтому не удивительно, что большинство вновь открываемых центров ЯМР расположены при крупных действующих источниках синхротронного излучения, с использованием которого и ведутся основные структурные исследования. Разрешение определяемой структуры, достигаемое в обоих методах, составляет 1.0–1.5 Å, требуемое количество образца — 30–50 мг. Правда, методы спектроскопии ЯМР пока на порядок уступают РСА по времени и стоимости определения одной структуры, но, судя по быстрому темпу развития исследований с использованием ЯМР, эти показатели для обоих методов скоро сравняются.

Прогресс, достигнутый за счет использования синхротронного излучения, автоматизированных систем кристаллизации и ввода образца, эффективных матричных устройств сбора и обработки данных, а также разработки метода многоволновой аномальной дифракции, превратил РСА в быстрый и удобный метод определения структуры биомолекул. Методы спектроскопии ЯМР стали основными пока что в относительно небольшом числе научных центров. В частности, спектроскопия ЯМР уже становится главной компонентой в исследованиях пространственной структуры биомолекул по крайней мере в нескольких крупных исследовательских центрах.^{2,5} К примеру, в японском Центре наук о геноме в прошлом году установлено сразу 20 высокопольных ЯМР-спектрометров. Очевидно, что спектроскопия ЯМР будет основным инструментом изучения взаимосвязи структуры белков и их биологической функции.

Современная структурная спектроскопия ЯМР формировалась в два этапа. Первый этап (1985–1995 гг.) характеризовался бурным развитием и интенсивным применением многомерных методов Фурье-спектроскопии[†] для исследования строения биомолекул.^{6–21} Вначале эти исследования проводили в жидких изотропных растворах с использованием методов двух- или трехмерной гомоядерной спектроскопии ЯМР, основанных на ядерном эффекте Оверхаузера (ЯЭО), а массы макромолекул не превышали 10 кДа.

Два принципиальных ограничения мешали дальнейшему развитию исследований. Во-первых, ширины резонансных линий в спектре ЯМР в растворе обратно пропорциональны времени спин-спиновой релаксации T_2 , уменьшающемуся с увеличением размеров молекулы, и времени вращательной корреляции. Вследствие этого снижается чувствительность используемых импульсных последовательностей, в которых применяют длительные задержки, необходимые для переноса когерентности.

Во-вторых, с увеличением молекулы усложняется спектр, поскольку увеличивается число активных для ЯМР ядер и число взаимодействий между ними.

В начале 1990-х годов были разработаны способы селективного $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -обогащения биомолекул, а также методы многомерной гетероядерной спектроскопии и спектроскопии тройного резонанса с импульсными градиентами. Вследствие этого массы исследуемых белков удалось увеличить до 25 кДа.²² По мере усовершенствования техники, используемой в спектроскопии ЯМР (появление высокопольных спектрометров на 700, 800 и 900 МГц, датчиков с импульсными градиентами магнитного поля и др.), а также разработки методов частичного и селективного дейтерирования биомолекул становилось возможным исследовать объекты большей массы — до 35–40 кДа.^{23–25} При комбинировании спектроскопии тройного резонанса с $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -обогащением и пердейтерированием можно исследовать белки массой до 50–60 кДа, а с использованием таких современных методов, как TROSY (Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy) и CRINEPT (Cross-correlated Relaxation-enhanced Polarization Transfer)^{26–33} — массой свыше 100 кДа.^{34–36} Так, в работе³⁷ определена структура октамерного белка массой 110 кДа. И это, конечно, не предел. Например, применяя недавно предложенные методы посегментного изотопного мечения,^{38,39} уменьшения времени вращательной корреляции за счет использования маловязких растворителей,⁴⁰ а также криогенные датчики и высокопольные спектрометры ЯМР (на 1 ГГц и более), можно существенно увеличить размеры исследуемых молекул, особенно если привлечь принципиально новые идеи и подходы.^{3,41}

Второй этап исследований структуры биомолекул методами спектроскопии ЯМР, начавшийся в 1995 г., ознаменовался появлением одного из таких подходов. Было предложено использовать явление ориентации биомолекул под действием магнитного поля спектрометра.^{42,43} Для ориентированных молекул можно определять дополнительные параметры сигнала ЯМР, содержащие структурную информацию, в первую очередь, константы дипольного взаимодействия (КДВ).⁴⁴ Однако даже в самых сильных магнитных полях ориентация биомолекул была очень слабой, и поэтому измеряли лишь КДВ непосредственно связанных ядер в биомолекулах с большой анизотропией магнитной восприимчивости. Точность определяемой структуры в экспериментах такого рода была не хуже, чем в экспериментах, основанных на ЯЭО, но все равно оставляла желать лучшего.

Авторы работы⁴⁵ предложили использовать для ориентации биомолекул мицеллярные растворы и разбавленные ЖК-фазы. В таких средах степенью ориентированности биомолекул можно легко управлять, изменяя условия эксперимента, например концентрацию компонентов и температуру. При этом можно подобрать оптимальные значения параметров порядка и упростить анализ спектров.

Используя методы спектроскопии ЯМР, можно определять ряд физических величин, содержащих информацию о межъядерных расстояниях и углах в молекуле. Большинство таких величин ориентационно-зависимы, т.е. зависят от ориентации биомолекул по отношению к направлению магнитного поля; в обычных изотропных растворах они вследствие быстрого вращения молекул усредняются до нуля. Правда, существуют параметры, содержащие косвенную информацию о расстояниях между магнитными ядрами и диэдральными углах, которую можно выявить и в экспериментах с изотропными растворами. Это, например, времена спиновой релаксации ядер в экспериментах по ЯЭО, зависящие от КДВ (D) между ними; значения констант спин-спиновых взаимодействий (КССВ) через три ковалентные связи (3J), или скорости кросс-коррелированной релаксации, зависящие от диэдрального угла между этими связями. Кроме

[†] Р.Эрнст (Швейцария) за работы в этой области в 1991 г. был удостоен Нобелевской премии по химии.

того, значения химических сдвигов некоторых протонов и атомов углерода сильно зависят от окружения и могут быть полезны при определении третичной структуры белков.

Несмотря на низкую точность данных, сложность и дороговизну, эксперименты на основе ЯЭО широко используют для определения пространственной структуры биомолекул в растворах. Недавно к таким параметрам как 3J и химические сдвиги добавили еще несколько параметров, характеризующих специфические свойства разных типов релаксации. Однако с использованием таких изотропных параметров можно установить лишь локальную структуру, тогда как с использованием ориентационно-зависимых величин можно определять как локальную, так и более дальнюю структуру.

Прямое количественное измерение ориентационно-зависимых параметров, например КДВ, из расщеплений в спектрах ориентированных молекул, бесспорно, предпочтительнее, чем их грубая оценка в экспериментах на основе ЯЭО в изотропных растворах при качественном анализе интенсивностей кросс-пиков. В первом случае мы имеем дело с эффектом, для интерпретации которого достаточно применения теории возмущений первого порядка; во втором случае данные эксперимента можно интерпретировать лишь с привлечением теории возмущений более высокого порядка (т.е. намного более грубого приближения), при этом они могут маскироваться другими эффектами. Кроме того, КДВ в спектрах ориентированных образцов можно измерять точнее и быстрее (причем между несравненно большим числом пар разнотипных ядер), чем оценивать в экспериментах на основе ЯЭО лишь между протонами. Это означает, что КДВ больше подходит для структурных исследований, что и было блестяще продемонстрировано в работе⁴⁶, авторы которой определили трехмерную структуру белковой цепи только с использованием параметров остаточных дипольных взаимодействий, без привлечения данных экспериментов по ЯЭО. Эта работа свидетельствует о совершающейся смене приоритетов в структурных исследованиях биомолекул с использованием методов спектроскопии ЯМР: на смену трудоемким экспериментам на основе ЯЭО в изотропных средах с приближенными оценками расстояний между некоторыми парами близких протонов приходят быстрые и эффективные эксперименты с измерением более информативных и разнотипных параметров для ориентированных молекул, прямо связанных с их геометрией.

К настоящему времени разработаны и продолжают разрабатываться методы измерения ориентационно-зависимых параметров ЯМР. Они основаны на исследованиях биомолекул, либо максимально ориентированных в твердой фазе, либо частично ориентированных в жидкой или ЖК-среде. Эти методы одинаково хороши для изучения как структур биомолекул, так и конформационных изменений, определения взаимной ориентации доменов, образования межмолекулярных комплексов и изучения динамических процессов.^{47, 48} Пока наиболее успешны эксперименты со слабым ориентированием биомолекул, хотя ожидается, что при изучении структуры и функции мембранных белков окажутся наиболее эффективными методы спектроскопии ЯМР максимально ориентированных биомолекул (в твердом состоянии).⁴⁹

В современных подходах используют сочетание упомянутых выше новых методов с «классическими» методами, основанными на ЯЭО, использовании вицинальных констант 3J , химических сдвигов и времен релаксации, что позволяет надежно определять структуру белков массой 100 кДа и более. Условно можно выделить три направления исследований биомолекул методами спектроскопии ЯМР, ведущихся параллельно:^{18–21}

- в жидких изотропных растворах;
- в слабо ориентированных средах;
- твердотельные эксперименты с вращением под магическим углом.

В данном обзоре рассмотрены возможности спектроскопии ЯМР слабо ориентированных биомолекул в растворах. Кратко охарактеризованы также методики исследования ЯМР неориентированных молекул. Подробно освещены способы ориентирования биомолекул, типы ориентационно-зависимых параметров, методики экспериментов, методы расчета, а также проанализированы основные результаты и перспективы применения спектроскопии ЯМР слабо ориентированных молекул при изучении белков, нуклеиновых кислот, олигосахаридов.

II. Методы исследования структуры неориентированных биомолекул в растворе

Структура биомолекулы может быть представлена либо набором декартовых координат (x , y , z) каждого атома, либо набором внутренних координат (для белков — это длины связей и углы ϕ , ψ , ω , χ_1 , χ_2 для каждого аминокислотного остатка (рис. 1)).

1. Ядерный эффект Оверхаузера и его использование в структурных исследованиях

Метод спектроскопии ЯМР на основе ЯЭО уже более 20 лет успешно применяют для определения трехмерной структуры биомолекул в растворах. В двумерных и трехмерных экспериментах определяют параметры ЯЭО, которые затем используют для расчета межпротонных расстояний. Исследования структур малых белков, транспортных РНК, олигонуклеотидов, взаимодействия белков с лигандами, нуклеиновых кислот друг с другом подробно описаны во множестве публикаций (см., например,^{7–25, 50}).

В основе ЯЭО лежит тот факт, что константа скорости дипольной кросс-релаксации обратно пропорциональна шестой степени расстояния между взаимодействующими ядрами. В экспериментах измеряют интенсивности кросс-пиков ЯЭО, которые пропорциональны константам скоростей кросс-релаксации. Таким образом, если одно из межпротонных расстояний (R_0) известно (например, из тривиальной ковалентной геометрии молекулы), то другое, неизвестное R_x , определяется из соотношения

$$R_x = \left(\frac{I_0}{I_x} \right)^{1/6},$$

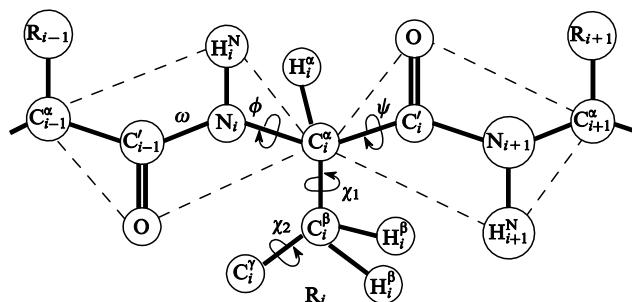


Рис. 1. Схема фрагмента полипептидной цепи белка.

Пунктирными линиями обозначены пептидные плоскости. Конформация главной цепи белка определяется углами ϕ и ψ каждого аминокислотного остатка R , а конформации боковых цепей — углами χ_1 и χ_2 .

где I_0 и I_x — интегральные интенсивности соответствующих кросс-пиков.

Двумерный (или трехмерный) спектр ЯМР белков содержит множество кросс-пиков ЯЭО, соответствующих различным парам протонов. В зависимости от интенсивности их подразделяют на сильные, средней интенсивности и слабые. Сильные кросс-пики соответствуют соседним по ковалентным связям протонам (например, геминальным протонам в метиленовых группах или вицинальным протонам в ароматических кольцах), а также соседним протонам в регулярной вторичной структуре белка (например, H^N-H^α вдоль цепи, $H^\alpha-H^\alpha$ и H^N-H^α в β -листах). Кросс-пики средней интенсивности обычно соответствуют парам H^N-H^α в спиралях. Даже для белков массой до 10 кДа таких откликов бывает порядка 100, этого достаточно для определения пространственной структуры белковой глобулы. К настоящему времени с использованием нескольких сотен (а иногда и свыше 1000) кросс-пиков определены структуры многих белков массами до 100 кДа.

Основное преимущество таких исследований перед исследованиями методом РСА заключается в том, что структура биомолекул определяется в растворе, а не в монокристалле. Известно, что структуры некоторых биомолекул при кристаллизации меняются, поэтому определение структуры в растворе, в частности, для медиков и биологов, предпочтительнее. К тому же в кристалле на молекулы действуют анизотропные кристаллические поля, так что несоответствие структур, определенных в кристаллическом состоянии и в растворе, еще не означает ошибочности одной из них.

Однако ЯЭО проявляется между близко расположенными (не более 5–6 Å) магнитными ядрами (в основном протонами), тогда как с помощью РСА можно определить позиции всех атомов. Еще одно важное различие этих методов проявляется в исследованиях подвижных молекул. Методом РСА определяют кристаллическую структуру как простую суперпозицию всех молекул, присутствующих в кристалле, тогда как в экспериментах на основе ЯЭО находят не сами расстояния, а некоторые усредненные величины $(\langle r_{ij}^{-6} \rangle)^{-1/6}$. Это означает, что в первом случае вклады всех флуктуаций в расстояния между ядрами в кристаллической структуре одинаковы, а во втором — вклады в измеряемые расстояния от состояний с близкими положениями протонов намного больше, чем от состояний с удаленными протонами, что приводит к кажущемуся сокращению усредненного расстояния.

Эксперименты на основе ЯЭО удачно дополняют РСА, особенно в тех случаях, когда кристаллографические данные малодоступны, при сравнительном исследовании олигонуклеотидов с различной последовательностью, а также при исследовании переходов между различными конформациями ДНК.

До недавнего времени информацию о геометрии биомолекул в растворах получали главным образом в экспериментах на основе ЯЭО. Но для установления структуры знания межпротонных расстояний, найденных в таких экспериментах, недостаточно. Поэтому привлечение любой дополнительной информации бывает полезно, как для уточнения, так и для облегчения процедуры определения структуры.

С ростом массы биомолекулы сигналы ЯЭО уширяются, что может привести к слиянию линий в спектре. С данным явлением можно бороться, применяя частичное дейтерирование, однако при этом значительно сокращается число сигналов ЯЭО и возрастает стоимость определения структуры. Поэтому привлечение дополнительной информации, полученной в других экспериментах, тем более необходимо.

2. Константы спин-спинового взаимодействия

Применение в структурных исследованиях КССВ через три связи 3J основано на их эмпирической зависимости от диэдрального угла θ , описанной Карплюсом:^{10, 13}

$$^3J(\theta) = A \cos^2 \theta + B \cos \theta + C.$$

Коэффициенты A , B и C зависят от типа конкретных ядер, составляющих диэдральный угол, их определяют при оптимизации экспериментальных констант 3J и значений углов, найденных из рентгеноструктурных данных высокого разрешения, для множества молекул. Для молекул белков таких констант несколько. Константа $^3J(H^N-H^\alpha)$, непосредственно связанная с торсионным углом ϕ пептидной цепи, наиболее удобна для структурных исследований, так как ее можно определить достаточно просто и точно. Информацию о другом торсионном угле пептидной цепи ψ содержат константы $^3J(N-H^\alpha)$ и $^3J(N-N)$, но обе они, к сожалению, малы и к тому же меняют знак. Зато информация о конформациях боковых цепей, в частности, о торсионном угле χ_1 , может быть получена с помощью КССВ для разных пар: $H^\alpha-H^\beta$, $N-H^\beta$, $C'-H^\beta$, $H^\alpha-C^\gamma$, $N-C^\gamma$, $C'-C^\gamma$.

Возможность использования в структурных исследованиях КССВ через одну или две связи до недавнего времени практически не изучалась. Однако с развитием спектроскопии ЯМР слабо ориентированных молекул появилась необходимость в разделении вкладов КССВ и КДВ через одну связь в наблюдаемые расщепления, так как исследователь наряду с КДВ каждый раз измеряет и КССВ. На первый взгляд, эти константы малоинформативны и точность их измерения низка, но, тем не менее, их можно использовать. Например, КССВ $C^\alpha-H^\alpha$ и $C^\alpha-C^\beta$ оказались «чувствительны» к торсионному углу ψ пептидной цепи.⁵¹ Число КССВ, пригодных для конформационных исследований нуклеиновых кислот и углеводов, больше, и их информативность выше, поэтому они лучше изучены.⁵² Знание КССВ важно еще и потому, что с их помощью можно планировать проведение экспериментов ЯМР с переносом когерентности через соответствующие связи.

3. Химические сдвиги

Химические сдвиги ядер зависят только от их локального окружения и в принципе содержат всю необходимую информацию для определения трехмерной структуры молекулы. Однако вычислить трехмерную структуру с использованием лишь химических сдвигов пока не удалось, хотя определенные успехи в этом направлении уже достигнуты.^{53, 54}

Химические сдвиги ядер 1H , ^{15}N , ^{13}C и ^{31}P широко используют в качестве граничных условий при определении структуры биомолекул. Известны эмпирические корреляции углов ϕ и ψ , определяющих конформацию участка пептидной цепи, и химических сдвигов ядер H^N , H^α , ^{15}N , $^{13}C'$, $^{13}C^\alpha$ и $^{13}C^\beta$ (см.⁵⁵). Например, химические сдвиги $^{13}C^\alpha$ и $^{13}C^\beta$ в α -спиралях и β -листах значительно различаются, что позволяет уверенно идентифицировать эти элементы вторичной структуры белков. Подобные корреляции найдены и для нуклеиновых кислот.⁵²

Содержащаяся в данных о химических сдвигах структурная информация частично дублирует информацию, получаемую с помощью констант 3J (например, об углах ϕ). Однако не все константы 3J удается измерить (из-за малости их значений, уширения или перекрытия линий в спектре), тогда как химические сдвиги ядер всех атомов можно определить.

Процедуры отнесения сигналов и определения химических сдвигов ядер почти полностью автоматизированы, их проводят на начальной стадии структурных исследований. По значениям этих величин можно достаточно точно установить и локализовать элементы вторичной структуры биомолекул,⁵⁶ что важно для дальнейшего анализа.

Химические сдвиги ядер определяют не только для получения промежуточных данных о структуре; их изменения при функционировании биомолекулы могут служить быстродействующим инструментом, с помощью которого можно изучать биохимические процессы, проводить скрининг низкомолекулярных лигандов и определять места их связывания с биомолекулой. Результаты таких исследований необходимы в первую очередь для разработки лекарственных препаратов.

4. Определение констант через одну водородную связь

Водородные связи — главный стабилизирующий фактор, определяющий вторичную и третичную структуры биомолекул. До недавнего времени о существовании водородных связей по параметрам сигналов ЯМР можно было судить лишь косвенно, например по скоростям обмена протонов, химическим сдвигам ядер ^1H и ^{15}N , изотопным сдвигам и пространственной близости партнеров.

Однако оказалось, что константы через одну водородную связь достаточно просто определить для молекул нуклеиновых кислот и белков. В частности, удалось измерить КССВ $^2J_{\text{N} \dots \text{HN}}$ между атомами ^{15}N пуриновых и пиримидиновых оснований в уотсон-криковских парах как для РНК,⁵⁷ так и для ДНК.²⁷ Установленные значения КССВ достаточно велики ($^2J_{\text{NN}}$ порядка 6–7 Гц); они зависят от длины водородной связи.⁵⁸ Поэтому измерение констант через водородную связь не только свидетельствует о ее наличии (об этом косвенно можно судить и по значениям химических сдвигов), но и позволяет определять ее длину.^{59, 60} Меньшие константы ($^1J_{\text{HN}}$ порядка 2–4 Гц) определены между протоном иминной группы и его акцептором ^{15}N в уотсон-криковских парах.

Для белков тоже найдены константы $^3J_{\text{CO} \dots \text{HN}}$,^{61–63} составившие 0.2–1.0 Гц. Они также зависят от длины водородной связи.⁶³

5. Релаксационные параметры

Один из релаксационных параметров — интенсивность пиков ЯЭО — отмечен выше.

Времена гетероядерной релаксации содержат информацию о внутримолекулярной динамике. Например, время спин-спиновой релаксации T_2 для ядра ^{15}N есть функция как частотно-зависимых, так и частотно-независимых составляющих спектральной плотности, а время спин-решеточной релаксации T_1 — функция только частотно-зависимых составляющих. Из-за анизотропии вращательной диффузии при отсутствии в молекуле движений с большой амплитудой (а следовательно, без уширения линий в спектре ЯМР) отношение T_1/T_2 для ядра ^{15}N в белковой молекуле с аксиально симметричным тензором диффузии зависит только от трех переменных: угла между вектором связи N–H и главной осью тензора диффузии, а также значений параллельной и перпендикулярной компонент тензора диффузии. Этот факт можно использовать для определения ориентации вектора связи N–H, а отношение T_1/T_2 можно включить как независимую переменную в число варьируемых параметров при определении структуры биомолекул.^{64, 65}

В последние годы для получения структурной и динамической информации о биомолекулах стали применять методы, в которых используют кросс-корреляцию (или интерференцию) релаксационных механизмов, связанных с

дипольным взаимодействием (ДДВ) и анизотропией химического сдвига (АХС).⁶⁶ Эти методы основаны на выявлении и использовании кросс-корреляций типа ДДВ–ДДВ,^{67–69} ДДВ–АХС^{70–73} или АХС–АХС.⁷⁴ В парамагнитных белках наблюдается еще один тип кросс-корреляции — между ДДВ и спином Кюри — суммарным магнитным моментом системы взаимодействующих ядер и неспаренного электрона.⁷⁵ Такие тензорные корреляции очень удобны для исследования динамики⁷⁶ и определения различных торсионных углов в биомолекулах.^{77, 78}

Например, для определения угла ψ в белках можно измерять скорости релаксации ДДВ($\text{C}^\alpha\text{--N}^\alpha$)–ДДВ(N--N^N),^{68, 69} ДДВ($\text{C}^\alpha\text{--N}^\alpha$)–АХС(^{15}N),⁶⁸ ДДВ($\text{C}^\alpha\text{--N}^\alpha$)–АХС($^{13}\text{C}'$)^{70, 71} и АХС($^{13}\text{C}'$)–АХС($^{13}\text{C}'$);⁷² для определения углов в фосфодиэфирной цепи РНК предложено⁷³ использовать кросс-коррелированную релаксацию ДДВ(C--H)–АХС(^{31}P).

Кросс-корреляция релаксационных параметров была использована также при исследовании гликозидной связи в полисахаридах,⁶⁹ изучении внутримолекулярной динамики в белках,^{76, 79} определении конформации сахарных циклов в РНК,⁸⁰ геометрии связывания металла в цинксодержащих молекулах белков.⁸¹ Исследования с использованием релаксационных параметров только начали развиваться, но уже принесли значительные результаты.^{82, 83} К примеру, благодаря таким исследованиям была реализована спектроскопия TROSY.

III. Изучение мембранных белков методами спектроскопии ЯМР твердого тела

В настоящее время в ряде лабораторий проводят исследования структуры биомолекул методами спектроскопии ЯМР твердого тела.^{84–91}

В твердой фазе ориентация биомолекул максимальна, однако из-за отсутствия у них вращательной и трансляционной степеней свободы в спектрах ЯМР проявляются линии, соответствующие взаимодействиям магнитных ядер не только в самой молекуле, но и с магнитными ядрами соседних молекул. Это приводит к усложнению спектра: появляется большое число спектральных линий, накладывающихся друг на друга. К тому же входящие в элементарную ячейку кристалла молекулы белка имеют разную ориентацию относительно осей кристалла, и, соответственно, в магнитном поле спектрометра КДВ для одних и тех же пар ядер будут иметь разные значения.

Чтобы упростить спектр ЯМР, можно использовать ЖК-фазы исследуемых веществ. В идеальном случае в спектрах должны проявляться лишь внутримолекулярные взаимодействия, а межмолекулярные — усредняться до нуля. Однако тривиальное использование ЖК-фаз не приведет к полному успеху — проблема та же: слишком много магнитных ядер в биомолекуле. Однако то, что межмолекулярные взаимодействия в спектре не проявляются, уже хорошо. Используя методы упрощения спектров ЯМР и учитывая однонаправленность главных осей молекул, можно гораздо точнее интерпретировать полученные результаты, чем при исследовании кристаллов. Это новое направление в настоящее время интенсивно развивается, особенно в исследованиях нерастворимых мембранных белков.

С участием мембранных белков осуществляются важнейшие процессы в клетках (межклеточные связи, преобразование сигналов, секреция токсинов, транспорт ионов и питательных веществ), поэтому они представляют интерес как потенциальные мишени для лекарств. Определить пространственную структуру мембранного белка методами РСА и ЯМР в жидкости сложно. Такие белки практически не кристаллизуются и не растворяются, а если и удается получить кристалл или раствор, то структура белков может не

соответствовать нативной. Кроме того, для понимания механизма функционирования мембранного белка важно знать расположение элементов вторичной структуры самого белка относительно мембраны.

К настоящему времени методом РСА определено всего несколько десятков структур мембранных белков с разрешением 0.3 нм, а структур растворимых белков с таким же разрешением — более 3000. Структура еще нескольких мембранных белков найдена с помощью электронно-микроскопического анализа двумерных кристаллов, полученных кристаллизацией липидных бислоев, содержащих белок. Однако таким способом не удается достичь удовлетворительного разрешения. Следовательно, для массового определения структур мембранных белков спектроскопия ЯМР наиболее перспективна.

Метод ЯМР твердого тела удобен для исследования мембранных белков в липидных бислоях, так как одновременно можно определять и третичную структуру встроенного в мембрану белка, и его ориентацию относительно поверхности мембраны.

Мембранные белки одинаково ориентированы относительно мембраны, но хаотически расположены на ее поверхности. Фактически и мембрана, и белок находятся в ЖК-состоянии, причем степень ориентированности биомолекул очень высокая. Этим обусловлены множественные дипольные расщепления линий, что делает результирующий спектр не разрешенным, как спектр обычных органических кристаллов. Однако в случае мембранных белков есть уникальная возможность, используя факт одинаковой ориентированности белков на мембране, приготовить образцы, в которых сами мембраны тоже одинаково ориентированы. Такой образец уже можно исследовать методами ЯМР твердого тела.

В большинстве этих методов вращение ориентированного образца под магическим углом сочетают с другими методиками спектроскопии ЯМР (многомерная спектроскопия, многоквантовые эксперименты и т.д.). Ориентационно-зависимая информация при этом теряется (из-за усреднения), но ее можно восстановить, анализируя, например, боковые полосы вращения.^{92–94}

Чтобы уменьшить значения КДВ для сильно ориентированных молекул и упростить спектр ЯМР, используют также вращение под магическим углом в спиновом пространстве, которое достигается за счет применения специальных импульсных последовательностей.

При вращении под магическим (или очень близким к нему) углом небольшие КДВ от удаленных ядер практически полностью усредняются. Остаются лишь вклады от неусреднившихся больших КДВ, обычно от прямо связанных или очень близких ядер. Поскольку большинство расстояний между такими ядрами известны с высокой точностью (исключение составляют расстояния между ядрами в местах контактов разных участков цепи), то из экспериментальных значений КДВ можно найти ориентацию каждой пары ядер в пространстве относительно направления магнитного поля. Набор таких параметров, названных ориентационными ограничениями, и будет определять пространственную конформацию биомолекулы. Этот метод, развитый в работах^{95–99}, можно успешно применять для определения структуры и полиморфизма мембранных белков.

Пока что в твердотельных экспериментах используют КДВ ковалентно связанной пары $^{15}\text{N} - ^1\text{H}$, которая лежит в плоскости пептидной связи. Потенциально пригодны КДВ прямо связанных гетероядерных пар $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$, $^{17}\text{O} - ^{13}\text{C}$ и $^{15}\text{N} - ^2\text{H}$,^{96,100} гомоядерных пар $^{13}\text{C} - ^{13}\text{C}$ и $^{15}\text{N} - ^{15}\text{N}$, а также ^2H -квадрупольные взаимодействия.⁹⁷ Предприняты первые попытки использовать константы взаимодействия обменивающихся протонов $^1\text{H} - ^1\text{H}$. Для их определения применяли

технику гомоядерного подавления диполь-дипольного взаимодействия в MAS (Magic Angle Spinning) спектрах высокодейтерированных белков и пептидов.^{101,102}

Константы дипольного взаимодействия $^{15}\text{N} - ^1\text{H}$ определяют в основном в экспериментах SLF (Separated Local Field)¹⁰³ и PISEMA (Polarization Inversion with Spin Exchange at the Magic Angle).¹⁰⁴ Методика данных экспериментов позволяет исключить гомоядерные межпротонные константы и резко повысить разрешение спектров. В настоящее время такие методики интенсивно развиваются.^{85,105,106} В твердотельных исследованиях биомолекул начали использовать известную методику REDOR (Rotational Echo Double Resonance).^{103,107,108}

В спектрах PISEMA, а также в обычных гетерокорреляционных спектрах ЯМР $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ наблюдаются легко диагностируемые кросс-пики, формирующие резонансные картины, названные Пизанской башней (PISA-Wheel), поскольку они соответствуют α -спиралям или β -листам, расположенным в теле мембраны немного наклонно. Эти картины служат прекрасными, легко визуально обнаруживаемыми индикаторами наличия элементов вторичной структуры (α -спирали или β -листа) и их ориентации относительно мембраны.^{109–112} Для визуализации подобных спектральных образов и их надежного распознавания, а также численного моделирования спектров белков разработана очень удобная программа SIMMOL,¹¹³ которая интегрирована в программу SIMPSON,¹¹⁴ используемую для анализа спектров белков в твердой фазе.

Отметим, что к мембранным белкам, если их поместить, например, в мицеллы, можно применять и обычные методы спектроскопии ЯМР в жидкости.^{115,116} Спектры ЯМР раствора таких капсулированных мембранных белков похожи на спектры растворимых белков. Для увеличения времен релаксации можно использовать маловязкие растворители или обращенные мицеллы.⁴⁰ Таким способом удалось установить строение трансмембранного домена мембранного белка А из *E.coli*, заключенного в додецилфосфиновые мицеллы,¹¹⁷ (структура оказалась идентичной структуре, определенной методом РСА в октилтетраоксилэтиленовых мицеллах), а также мембранного белка OmpX из *E.coli* в дигексаноилфосфатидилхолиновых мицеллах.³³

Первым мембранным белком, структура которого была определена методами твердотельного ЯМР с использованием изотопных меток, был грамицидин А.^{96,118–120} Затем с применением экспериментов PISEMA была расшифрована структура трансмембранного сегмента М2 никотинового ацетилхолинового рецептора,^{121,122} которая представляла собой одиночную спираль, расположенную под углом 12° к нормали мембраны. Сконструированная методом молекулярного моделирования мембранная пора содержала пять таких спиралей. В схожих экспериментах установлено, что белок М2 вируса гриппа А формирует ионный канал из четырех спиралей, расположенных под углом 35° к нормали мембраны,^{123,124} а белок Vpu формирует под углом 15° аналогичный канал в мембране HIV-1.¹²⁵ Структурные и топологические исследования ряда других мембранных белков рассмотрены в работах^{126–128}.

При численном моделировании твердотельных спектров ЯМР высокого разрешения однородно изотопно-обогащенных мембранных белков родопсина и порина в ориентированных липидных слоях получены результаты, позволяющие повысить эффективность используемых экспериментальных методик.¹²⁹

В базе данных PDB пока зарегистрированы структуры только двух мембранных белков: грамицидина А и М2 ацетилхолинового рецептора. Но в связи с интенсивным развитием методик спектроскопии ЯМР твердого тела имеются

все основания надеяться, что в ближайшие годы число таких структур возрастет.

Обнадеживающие результаты получены и при разработке методик определения структуры монокристаллических образцов ^{13}C - и ^{15}N -обогащенных пептидов.^{88, 130}

Сильная ориентированность молекул в твердых образцах создает специфические проблемы, для решения которых используют методики, позволяющие искусственно уменьшить эффекты сильной ориентированности до приемлемых величин, обычно соответствующих слабо ориентированным молекулам. Слабое ориентирование молекул может быть реализовано и в жидкой фазе.

IV. Способы ориентирования биомолекул в растворе

Идея ориентировать молекулы для получения структурной информации возникла в начале 1960-х годов. Практическое воплощение она получила позже, когда появился метод ориентации исследуемых молекул путем помещения их в ЖК-среду, который стали применять для определения структур низкомолекулярных соединений.¹³¹ Другие способы ориентирования тогда казались неконкурентоспособными из-за малости достигаемой степени ориентированности и ограничения на число магнитных ядер в молекуле, которое не должно превышать 10–12, поскольку интерпретация спектра ЯМР становится невозможной из-за сливания линий.

Возможность исследовать биомолекулы таким методом казалась в то время нереальной. Однако парадоксальная, на первый взгляд, идея использовать для структурных целей слабо ориентированные молекулы позволила упростить спектр ЯМР и снять ограничения на число магнитных ядер в молекуле. К тому же, линии в спектрах ЯМР слабо ориентированных биомолекул в растворе в отличие от линий сильно ориентированных молекул практически не уширяются из-за более быстрой реориентации.

Методов, пригодных для слабого ориентирования биомолекул, гораздо больше, чем методов, пригодных для силь-

ного ориентирования. Характер ориентации зависит от специфических взаимодействий биомолекулы с ориентирующими силами или частицами, поэтому механизмы ориентации в средах различной природы могут быть принципиально различными, что очень важно для подбора оптимальных условий эксперимента, упрощения интерпретации данных, а также для автоматизации экспериментов и расчетов.

Наиболее простые методы ориентирования биомолекул — под действием магнитных или электрических полей, давления, в результате сжатия или растяжения микропористых матриц, при движении и ускорении в потоке. В качестве ориентирующих сред можно использовать лиотропные жидкие кристаллы, полимерные гели, цеолиты и др. Практически все эти методы упомянуты в обзоре¹³². Ориентация частицами осуществляется за счет стереоспецифического взаимодействия исследуемых биомолекул с сильно анизотропными, хорошо ориентирующимися под действием магнитного поля частицами дискообразной (бицеллы, мембранные фрагменты) или стержнеобразной (фаги, вирусы) формы. Молекулы ориентирующей среды, в свою очередь, могут ориентироваться (доориентироваться, реориентироваться) под действием магнитного поля спектрометра или могут сохранять свою исходную ориентацию.

Среды, ориентирующие за счет стерических взаимодействий, предпочтительнее, так как они не влияют на времена вращательной корреляции, и, следовательно, ширины линий в спектре ЯМР не меняются. Упорядочение при комплексообразовании, как правило, сильно влияет на механизмы вращательной корреляции и, следовательно, на T_2 . Ориентирующие свойства различных сред подробно рассмотрены в обзорах^{133–135}. В настоящее время интенсивно ведутся поиски новых способов ориентирования биомолекул. На рис. 2 схематически представлены различные типы ЖК-сред, используемых в спектроскопии ЯМР для слабого ориентирования биомолекул.

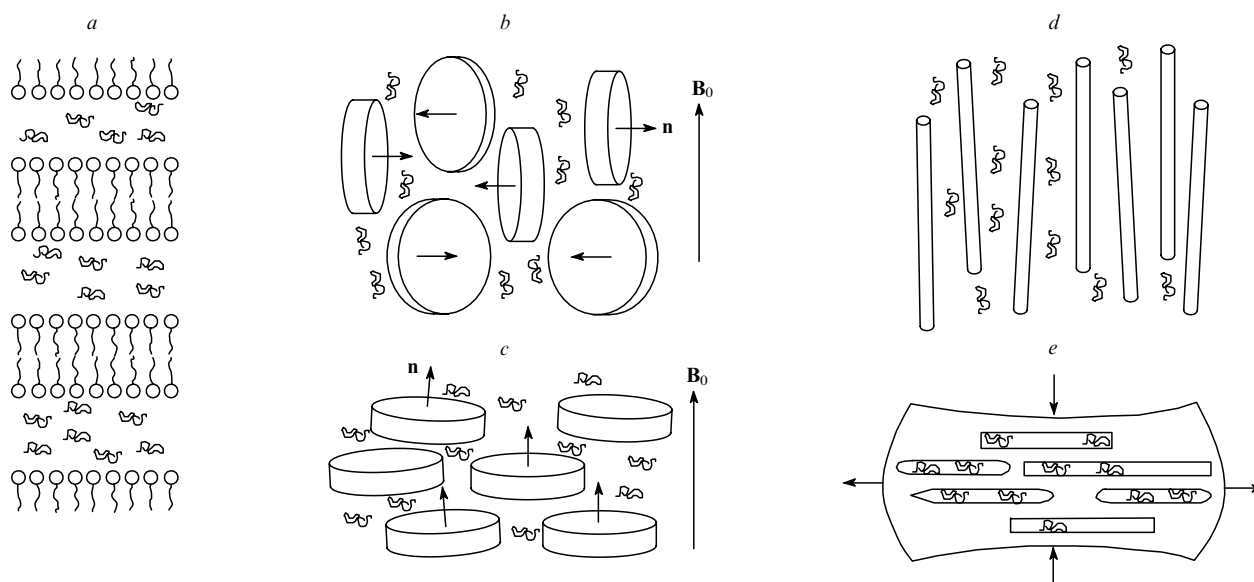


Рис. 2. Схематическое изображение сред для слабого ориентирования биомолекул.

a — ламеллярные фазы Геллфриха с удаленными друг от друга бислоями; *b* — водный раствор дискообразных (\mathbf{n} — нормаль к плоскости диска) частиц с отрицательной анизотропией диамагнитной восприимчивости, ориентирующихся перпендикулярно направлению магнитного поля \mathbf{B}_0 ; *c* — водный раствор таких же частиц с положительной анизотропией диамагнитной восприимчивости, ориентирующихся параллельно направлению магнитного поля \mathbf{B}_0 ; *d* — водный раствор стержнеобразных частиц (сuspension нитевидных фагов и вирусов, кристаллиты целлюлозы); *e* — растянутые или сжатые пористые полимерные гели.

1. Ориентация под действием внешнего магнитного поля

Молекулы с ненулевой анизотропией магнитной восприимчивости могут ориентироваться под действием внешнего магнитного поля. Ориентация молекул в растворе подчиняется закону Больцмана, а степень ориентированности пропорциональна квадрату напряженности магнитного поля.¹³⁶ На практике упорядочение молекул очень мало и в обычных условиях его не наблюдают.

Впервые частичное ориентирование молекул под действием магнитного поля, приводящее к новым или дополнительным расщеплениям линий в спектрах ЯМР высокого разрешения, наблюдал Ботнер-Бай с сотр.^{137, 138} Объектом исследования был парамагнитный комплекс бис[*n*-толил)-трис(пиразолил)борато]кобальт(II). Ориентирование под действием магнитного поля было очень слабым и наблюдалось лишь у некоторых молекул, в основном комплексов с парамагнитными металлами. По мере развития приборной базы для ЯМР магнитные поля в спектрометрах увеличивались, поэтому ориентационные эффекты стали наблюдать все чаще,¹³⁹ и для точного определения КССВ их приходилось учитывать.

Авторы работы⁴² показали, что и биологические молекулы, например дуплексы и квадруплексы ДНК, способны ориентироваться в магнитном поле спектрометра. В частности, они наблюдали относительно большие изменения констант $^1J_{\text{CH}}$ в додекамерах ДНК при увеличении магнитного поля. Было предложено использовать данный эффект в структурных исследованиях.

Группой исследователей под руководством Престегарда⁴³ продемонстрировано ориентирование молекул парамагнитного белка цианометмиоглобина под действием магнитного поля. Измеренные значения $^1J_{\text{NH}}$ отличались от известных. Различие констант (от -1 до 5 Гц) было приписано остаточным дипольным взаимодействиям $^{15}\text{N}-^1\text{H}$.

Авторы статьи¹⁴⁰ доказали ориентацию под действием магнитного поля даже диамагнитного ^{15}N -обогащенного белка убиквитина человека. Анизотропия магнитной восприимчивости этого белка на порядок меньше, чем цианометмиоглобина или додекамеров ДНК, соответственно меньше и остаточные константы (< 0.3 Гц). Исследования проводили на трех спектрометрах ЯМР с разными магнитными полями. Константы $^1J_{\text{NH}}$ измеряли двумя методами. Установлено, что константа включает два вклада: ориентационно независимый, обусловленный динамическим частотным сдвигом, и ориентационно-зависимый, обусловленный КДВ $^{15}\text{N}-^1\text{H}$. В работе¹⁴¹ были измерены остаточные дипольные взаимодействия $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ для того же белка, обогащенного ^{13}C . Измерения проводили на двух спектрометрах с рабочими частотами 360 и 750 МГц. Однако остаточные дипольные взаимодействия были относительно малы (из-за слабой ориентированности биомолекул) и не пригодны для структурных исследований.

Комплексы белков с ДНК или с парамагнитными металлами под действием магнитного поля ориентируются гораздо лучше.

2. Ориентация, индуцированная парамагнитными ионами

Для повышения ориентированности биомолекул в магнитном поле необходимо увеличить анизотропию магнитной восприимчивости этих молекул или ориентирующей системы (мембраны, среды и др.), что можно осуществить, например, при помощи добавок парамагнитных ионов металлов (в основном редкоземельных). Эти ионы образуют парамагнитный комплекс с исследуемой молекулой, который лучше ориентируется в магнитном поле спектрометра. Впервые это показано на парамагнитном комплексе миоглобина.⁴³

Достижимая степень ориентированности не очень велика и уступает степени ориентированности, которую получают в разбавленных ЖК-средах, но вполне достаточна для структурных исследований.

Парамагнитный ион можно связать с исследуемой биомолекулой несколькими способами. Некоторые белки уже изначально содержат парамагнитные ионы, например упомянутый выше миоглобин или гем-содержащие белки. В других металлсодержащих биомолекулах можно заменить диамагнитные ионы металлов на парамагнитные. Белки, не содержащие металл, можно нарастить, добавив к одному из концов белковый фрагмент, включающий атомы металла. В зависимости от закрепления парамагнитной метки на С- или N-конце ориентация исследуемой биомолекулы будет различной. Это позволяет получить дополнительную структурную информацию и оказывается весьма полезным для снятия вырождения ориентационных данных при определении трехмерной структуры биомолекулы. При последовательном замещении нескольких разных ионов в исследуемой биомолекуле можно достичь множественных ее ориентаций.

Авторы работы¹⁴² определили положение иона Eu^{3+} в комплексе Eu -квадруплекс ДНК, используя магнитное упорядочение, вызванное парамагнитным ионом.

Вследствие ориентации, которая была индуцирована замещением в биомолекулах, содержащих кальций, иона Ca^{2+} на ионы лантанидов¹⁴³⁻¹⁴⁷ (в частности, на Tb^{3+} (см.¹⁴⁴), либо на Ce^{3+} (см.¹⁴⁶)), появилась возможность наблюдать дипольные расщепления и определить структуры ряда белков. Такое же замещение позволило измерить КДВ для пар ядер в группах NH_2 и исследовать конформационную подвижность боковых цепей остатков аспарагина и глутамина в молекуле белка Ca_2 -кальбинина.¹⁴⁵

Благоприятным для определения структуры является случай, когда имеется конкуренция между двумя ориентирующими факторами, например парамагнитным ионом и ЖК-средой. В таких случаях результирующие КДВ равны сумме КДВ для исходной диамагнитной молекулы белка, индуцированных ЖК-фазой и индуцированных парамагнитным ионом. При замене диамагнитного иона белка на различные парамагнитные ионы можно однозначно определять тензор ориентации.¹⁴⁸

Перспективным является метод закрепления стандартной парамагнитной метки к N- или С-концу молекулы белка. В качестве меток предложены различные маленькие белки и белковые фрагменты, такие как белок Zn-finger, в котором диамагнитный ион Zn^{2+} можно заместить на парамагнитные ионы Co^{2+} и Mn^{2+} (см.¹⁴⁹), или концевой фрагмент EF-hand белка онкомодулина, состоящий из 12 аминокислотных остатков, в котором ион Co^{2+} можно заместить на парамагнитные ионы редкоземельных элементов.¹⁵⁰ Арсенал подобных меток разнообразен.¹⁵¹ В работе¹⁵² для добавления парамагнитной метки к N-концу исследуемого белка предложена самая короткая, состоящая всего из трех аминокислотных остатков, последовательность, связывающая ион Cu^{2+} . Молекулы белка, содержащие парамагнитную метку, обладают значительной анизотропией парамагнитной восприимчивости и хорошо ориентируются в магнитном поле, тогда как ориентация диамагнитного белка очень мала. Регистрируя спектры ЯМР до и после замещения, можно найти значения дипольных констант, а также дипольных сдвигов. Если в экспериментах по парамагнитной релаксации провести замещение иона Mn^{2+} на другой парамагнитный ион, то можно определить расстояние между неспаренной электронной парой и протоном амидной группы. Зная эти расстояния и дипольные сдвиги протонов амидных групп, можно вычислить координаты z для этих протонов.¹⁴⁹

Наличие парамагнитного иона в биомолекуле, кроме эффекта ориентирования (или переориентирования) в маг-

нитном поле и возможности измерять КДВ позволяет измерять и другие параметры, содержащие структурную информацию. В частности, это парамагнитные сдвиги ядер, константы кросс-коррелированной релаксации между спинами электрона и ядра,^{153, 154} а также между спинами ядер и спинон Кюри.^{75, 155, 156}

Псевдоконтактные сдвиги, обусловленные дипольным взаимодействием между магнитными моментами электрона и ядра, также содержат структурную информацию и могут быть использованы как дополнительные параметры при определении структуры белка.¹⁵⁷ Таким способом был исследован парамагнитный гем-содержащий белок крысиного цитохрома b₅ в парамагнитном (окисленном) и диамагнитном (восстановленном) состояниях.¹⁵⁸ Структуры, определенные по данным, полученным в экспериментах на основе ЯЭО, с помощью КДВ и с использованием информации о псевдоконтактных сдвигах, хорошо согласуются друг с другом.

С помощью данных о дипольных взаимодействиях можно определить анизотропию магнитной восприимчивости всего белка. В частности, при сопоставлении друг с другом и с результатами работ^{159, 160} дипольных взаимодействий и анизотропий магнитной восприимчивости белка цитохрома-с' из *Rhodobacter capsulatus* в парамагнитном и диамагнитном состояниях, найденных несколькими способами, отмечено их хорошее соответствие. Установлено также, что исследованный белок в растворе находился в форме мономера.

С учетом эффекта самоориентации молекул цитохрома b₅₉₂ из *E.coli*, содержащего гем в окисленном состоянии, авторам работы¹⁶¹ удалось уточнить структуру этого белка и разделить диамагнитный и парамагнитный вклады в полную магнитную анизотропию молекулы.

3. Ориентация под действием электрического поля

В качестве ориентирующего фактора можно использовать электрическое поле, однако его применение ограничивает возможное протекание электрохимических и электроконвективных процессов с участием биомолекул в водных и водно-солевых растворах.^{162, 163}

Впервые электрическое поле для ориентирования молекулы *n*-нитротолуола использовали авторы работы¹⁶⁴. Это исследование было предпринято для определения знака КССВ.

Ориентирование молекул под действием электрического поля имеет несомненное преимущество по сравнению с ориентированием под действием магнитного поля: отпадает необходимость проведения измерений минимум в трех спектрометрах ЯМР для отделения ориентационных эффектов от эффектов, вызванных динамическими частотными сдвигами; достаточно проведения эксперимента на одном спектрометре, но с тремя разными значениями электрических полей.

В работах^{165, 166} предложено использовать переменное импульсное электрическое поле, синхронизированное с используемой последовательностью радиочастотных импульсов. В этом случае возможно проведение многомерных экспериментов ЯМР с включением и выключением электрического поля в определенные моменты. Авторы разработали методику двух двумерных экспериментов для определения КДВ. В одном эксперименте электрическое поле включают лишь для второго измерения, в котором и наблюдают дипольные расщепления; а в прямом измерении наблюдают изотропные химические сдвиги. В другом эксперименте электрическое поле включают только во время смешивания, в результате наблюдают кросс-пики только для пар, связанных дипольным взаимодействием. В таких экспериментах

использовали переменные электрические поля частотой 28.5 кГц и напряженностью 40–70 кВ·см⁻¹.

Аналогичный двумерный эксперимент ЯМР ²H по наблюдению корреляции между изотропным химическим сдвигом и остаточными анизотропными взаимодействиями (в данном случае квадрупольными, наводимыми импульсно-модулированным постоянным электрическим полем) предложен в работе¹⁶⁷. Для уменьшения влияния молекулярного движения на измеряемый сигнал применяют многоквантовую фильтрацию.^{168, 169} Предложенная схема одинаково хорошо подходит и для дипольно-связанных систем со спином 1/2.

В рассмотренных экспериментах в качестве ориентируемого соединения был выбран нитробензол, глубоко очищенный от ионных примесей. У молекул ряда белков большие, чем у нитробензола, дипольные моменты, однако пока неясно, насколько применим метод ориентации под действием электрического поля к биомолекулам. Такие исследования пока только начинаются.

4. Ориентация в жидкокристаллических средах

Самоориентация биомолекул (за исключением молекул, содержащих парамагнитные центры) даже под действием самых сильных магнитных и электрических полей очень мала. Большее ориентирования можно достичь, поместив биомолекулу в ЖК-среду, которая ориентируется в магнитном поле, ориентирует и помещенные в нее биомолекулы. Такая среда должна удовлетворять ряду требований: она должна смешиваться с водой, не должна химически взаимодействовать с исследуемой молекулой, должна допускать высокие концентрации исследуемых биомолекул и необходимых буферных компонентов, а также быть стабильной в течение длительного времени в широких температурных пределах. Но все ЖК обладают высокой степенью ориентированности, поэтому основная трудность при поиске таких систем заключается в требовании слабого ориентирования помещенных в них биомолекул, которое должно быть на несколько порядков меньше ориентированности молекул ЖК.

В результате систематического поиска был найден ряд ЖК-систем, пригодных для структурных исследований биомолекул. Для слабого ориентирования биомолекул в первую очередь были испробованы традиционные лиотропные ЖК-системы, например такие, как водно-спиртовые растворы четвертичных солей аммония, пиридиния^{170, 171} и др. Простое разбавление водой позволяет в какой-то степени уменьшить ориентированность в таких системах, но лишь до некоторой критической концентрации, ниже которой система перестает быть жидкокристаллической, а следовательно, и ориентированной. Наиболее подходящими оказались ЖК-среды на основе систем цетилпиридинийхлорид/гексанол¹⁷⁰ и цетилпиридинийбромид/гексанол.¹⁷¹ Эти системы формируют ламеллярные фазы типа фазы Геллфриха, состоящие из двойных слоев, которые могут быть раздвинуты при добавлении растворителя достаточно далеко друг от друга, настолько, что расстояние между ними будет намного превышать толщину самого бислоя (см. рис. 2,а). Такие лиотропные фазы оказались очень удобными и простыми системами, достаточно стабильными в широкой области температур и концентраций. Они выдерживают концентрации солей, оптимальные для существования биомолекул, и сохраняются в течение длительного времени. Магнитная анизотропия пиридиниевых колец определяет ориентацию ламелл в магнитном поле — оси симметрии ламелл располагаются параллельно направлению поля.

В работе¹⁷² предложена новая неионная лиотропная ЖК-среда на основе смесей алкилполиэтиленгликолей и алкано-

лов, обладающая определенными преимуществами. В частности, раствор можно приготовить вне магнитного поля спектрометра. Вязкость образца мала, и его можно перенести в ампулу просто пипеткой. В магнитном поле композиция быстро ориентируется. Компоненты данной системы коммерчески доступны и недороги по сравнению с компонентами других систем, используемых при исследовании биомолекул методами спектроскопии ЯМР. Их одинаково успешно можно применять для исследования как белков, так и нуклеиновых кислот. К преимуществам этих систем относятся их низкая чувствительность к pH и к высоким концентрациям солей и белка.

5. Ориентация дискообразными частицами

а. Бицеллы

Дискообразные частицы (бицеллы, мембранные фрагменты и др.) также способны ориентироваться под действием магнитного поля, формировать упорядоченные ЖК-среды и ориентировать биомолекулы, находящиеся вместе с ними в растворе.

Впервые дискообразные смешанные мицеллы как модельную мембранную систему для исследований ЯМР предложили Рэм и Престегард.¹⁷³ Но наиболее удобными для этой цели оказались бицеллы, образующиеся в водных растворах липидов и ПАВ и представляющие собой дискретные бислойные дископодобные образования.¹⁷⁴ Они одинаково пригодны как для исследования мембранных белков, встраивающихся и закрепляющихся в бицеллах, методами ЯМР твердого тела или ЯМР в жидкости, так и для исследований ЯМР водорастворимых белков в присутствии бицелл, ориентирующихся в магнитном поле и ориентирующих молекулы белков за счет специфического взаимодействия с ними.^{175–179}

Бицеллы как среда для исследований биомолекул привлекли еще большее внимание исследователей, когда выяснилось, что ферменты в них сохраняют свою активность.¹⁶⁷ Использовать разбавленный раствор бицелл в качестве ориентирующего растворителя для биомолекул предложили Тжандра и Бакс.^{45,177} Уже первые результаты показали, что расстояния и углы, определенные с использованием КДВ $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$, $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ и $^{13}\text{C} - ^{13}\text{C}$ в молекулах убиквитина человека в разбавленных бицеллярных ЖК-средах, соответствовали аналогичным параметрам в его кристаллической структуре.¹⁷⁸

Бицеллы (особенно содержащие фосфолипиды) гораздо больше похожи на нативные мембраны, чем маленькие мицеллы. Поэтому определенная структура мембранных белков, капсулированных в бицеллы, будет более правдоподобна.¹⁸⁰ (Хотя, появились сведения об индуцированных мицеллами изгибах биомолекул.¹⁸¹) Если размеры дисков бицелл малы, то они свободно и быстро реориентируются в растворе и не ориентируются под действием магнитного поля. Из таких бицелл можно получить идеальную систему для исследования капсулированных мембранных белков стандартными методами ЯМР высокого разрешения, используемыми при изучении водорастворимых белков.¹⁸² Кроме того, бицеллу намного легче ориентировать магнитным полем, чем круглую мицеллу со встроенным белком. Это позволяет при исследовании мембранных белков, капсулированных в бицеллах, применять методики, использующие остаточные дипольные взаимодействия.

Анизотропная бицелла с большим значением отношения радиуса к ее толщине способна ориентироваться под действием внешнего магнитного поля. Меняя состав и соотношение компонентов, а также их концентрацию в водном растворе, можно плавно изменять степень ориентирования

бицелл, а следовательно, и ориентирования изучаемых биомолекул (находящихся в водной фазе или внутри бицелл).

При исследовании капсулированных в бицеллы мембранных белков и пептидов обычно используют большие концентрации фосфолипидов. Таким способом была определена ориентация N-терминального фрагмента белка ARF1 относительно поверхности бицеллы, ориентированной в магнитном поле,¹⁸³ а также проведено сравнение ориентации того же фрагмента относительно поверхностей мицеллы и бицеллы.¹⁸⁴

Ниже мы рассмотрим применение бицелл для исследований биомолекул только в растворах. Изменяя концентрации компонентов, в таких системах можно в широких пределах менять степень упорядоченности растворенных биомолекул для достижения желаемых величин остаточных дипольных расщеплений. В систему можно вводить различные добавки, улучшающие ее свойства.

Бицеллы состоят по крайней мере из смеси двух фосфолипидов с длинными и короткими гидрофобными «хвостами», причем фосфолипиды с длинными цепями формируют плоскую часть поверхности диска, а с короткими — закругленные края. Типичная толщина липидного бислоя 40–50 Å. Размеры самих бицелл увеличиваются с увеличением молярного отношения длинноцепных и короткоцепных липидов.¹⁸⁵ Одним из важнейших свойств таких систем является их способность при изменении температуры переходить из нематического ЖК-состояния в изотропное, при этом можно регистрировать спектры растворенных молекул в обоих состояниях системы, что необходимо для определения дипольных вкладов в наблюдаемые расщепления. В частности, переход базовой композиции DMPC/DHPC (DMPC — димиристоилфосфатидилхолин, DHPC — дигексаноилфосфатидилхолин) из нематического состояния в изотропное происходит при 35°C. Это наиболее широко применяемая система. Она образует упорядочивающуюся ЖК-фазу при очень низких концентрациях бицелл (> 3%). Расстояния между отдельными бицеллами в растворе достигают 300 Å, этого вполне хватает для размещения между ними биомолекул. Радиус диска прямо пропорционален отношению $[\text{DMPC}]/[\text{DHPC}]$ и обратно пропорционален полной концентрации фосфолипидов в воде при их постоянном относительном соотношении.¹⁸⁶

Техника приготовления образцов для исследований ЯМР и свойства базовой бицеллярной системы DMPC/DHPC подробно описаны в литературе. Изучена зависимость стабильности и ориентирующих свойств такой среды от температуры, pH, состава солей, относительных концентраций компонент и добавок.^{187–189}

Свойства бицелл (размеры, форму, поверхностный заряд, анизотропию диамагнитной восприимчивости или диэлектрической проницаемости) можно менять в широких пределах. Обычные бицеллы стабильны лишь в узкой области температур и pH. Для расширения температурной области, повышения стабильности, а также увеличения ориентирующей способности и изменения типа ориентации в бицеллярные системы можно добавлять заряженные липиды,¹⁹⁰ ароматические ПАВ.¹⁹¹ Они компенсируют разрушающее влияние высоких концентраций солей на систему, а также минимизируют взаимодействия между исследуемой макромолекулой и бицеллой. Этот эффект проявляется как с положительным, так и с отрицательно заряженными добавками. Добавка катионных липидов придает системе слабый положительный заряд, что влияет на ориентацию белков, обусловленную электростатическими и стерическими эффектами.¹⁹²

В настоящее время найдено множество разных композиций, образующих в определенных условиях бицеллярные водные растворы.¹⁷⁹ Среди них наиболее перспективны DLPC/CHAPSO¹⁹³ (DLPC — дилаурилфосфатидилхолин)

для исследований в широкой области температур и DIODPC/CHAPSO¹⁹⁴ (DIODPC — 1,2-ди-*O*-додecil-*sn*-глицеро-3-фосфохолин) для исследований макромолекул в очень кислых средах. Авторы работы¹⁹⁵ модифицировали систему DMPC/DHPC, добавив 25% по массе димиристоилфосфатидилсерина (DMPS) или димиристоилфосфатидилглицерина (DMPG). Такие «кислые» бицеллы стабильны при pH от 5.5 до 7 и пригодны для исследований ЯМР мембранных белков, поскольку природные мембраны часто бывают заряжены, так как в их состав входят отрицательно заряженные липиды.

Многие бицеллярные системы подвержены гидролизу, что мешает проведению длительных (многодневных) экспериментов. Чтобы обеспечить устойчивость бицелл к гидролизу, Оттигер и Бакс¹⁹⁶ предложили заменить диацильные фосфолипиды их диалкильными аналогами. Новые системы бицелл по ориентирующим свойствам очень похожи на системы типа DMPC/DHPC, но, в отличие от них, пригодны для работы как в кислых, так и в основных средах. Устойчива к гидролизу и система DIODPC/CHAPSO.¹⁹⁴

Механизм упорядочения биомолекул бицеллами сложен и включает, кроме стерического отталкивания, электростатические взаимодействия и адсорбцию на поверхности бицеллы. Стерические взаимодействия обычно невелики, и их можно легко моделировать.¹⁹⁷

Ориентировать бицеллы можно разными способами: добавлять к С-концу молекулы белка дополнительный пептидный «хвост», например так называемый пептид Hi-tag; изменять pH; добавлять катионные липиды, которые придут системе слабый положительный заряд; добавлять частицы с большой анизотропией диамагнитной восприимчивости или парамагнитные ионы.¹⁹² Ориентацию директора бицеллярной ЖК-фазы можно варьировать и при помощи вращения образца.¹⁹⁸

Обычно степень упорядочения бицелл и переход в изотропное состояние бицеллярной ЖК-системы фиксируют путем измерения квадрупольных расщеплений в спектре тяжелой воды, являющейся основным компонентом системы. Предложен и другой метод измерения упорядочения фосфолипидных бицелл в магнитном поле,¹⁹⁹ основанный на спектроскопии ЯМР^{31P}.

Морфология трех лиотропных ЖК-фаз — бицеллярной, смеси монододecilового эфира пентаэтиленгликоля с гексаноном и системы цетилпиридинийбромид – гексаноном — подробно исследована в экспериментах по анизотропии трансляционной диффузии.²⁰⁰ Бицеллы остаются стабильными при исследованиях систем под давлением. Интерес к таким исследованиям в настоящее время возрастает.²⁰¹

Таким образом, лиотропные бицеллярные системы являются очень удобной средой для изучения ориентированных белков. Однако существует ряд белков, которые при взаимодействии с бицеллами разрушают их, поэтому исследование строения таких белков с помощью бицелл проблематично.^{178, 202}

б. Ориентация биомолекул в бицеллах, допированных ионами редкоземельных элементов

В магнитном поле бицеллы обычно ориентируются, так, что их нормаль перпендикулярна направлению поля,²⁰³ плоскости же дисков расположены хаотично. Эту ориентацию можно изменить, добавив парамагнитные ионы, либо включив в состав бицелл ароматическое соединение или макромолекулы с большой анизотропией диамагнитной восприимчивости.

Ориентирующие свойства бислойных мембран, допированных ионами РЗЭ,^{204–207} весьма привлекательны не только для исследования мембранных белков, но и для исследования капсулированных в них белков в растворе.^{150, 208, 209} Такая

система совмещает два способа упорядочения биомолекул — под влиянием мембраны и за счет действия парамагнитных ионов. При наличии ионов Er^{3+} , Eu^{3+} , Tm^{3+} или Yb^{3+} увеличивается отрицательная диамагнитная анизотропия бицелл, ось симметрии которых становится параллельной магнитному полю. При этом вместе с бицеллами переориентируются находящиеся в них биомолекулы.^{204, 205} Переход, сопровождающийся при добавлении парамагнитных ионов изменением ориентации бицеллярной системы по отношению к магнитному полю с перпендикулярной на параллельную, как и само образование ЖК-фазы при увеличении концентрации бицелл — кооперативные явления, зависящие от взаимодействий между бицеллами и температуры. В ряде случаев наблюдались два типа упорядочения, равновесие между которыми зависело от концентраций парамагнитных ионов и бицелл.²⁰⁸

Систематическое исследование смесей фосфолипидов с длинными и короткими цепями в широком диапазоне концентраций и температур методом малоуглового рассеяния нейтронов показало наличие в них фаз с различной морфологией — в виде ламелл, мультиламелл, мономембранных везикул и бицеллярных дисков.²¹⁰

Однако большая концентрация парамагнитных ионов в системе приводит к нежелательным уширениям и сдвигам линий в спектрах ЯМР, что затрудняет их анализ. При добавлении фосфолипидных хелатов в эквимольном соотношении с парамагнитными ионами²⁰⁶ происходит закрепление последних на встроенных в мембрану хелатах, и парамагнитные эффекты нивелируются. К тому же из-за упорядоченности самих комплексов хелатов с РЗЭ в мембранах суммарное значение анизотропии диамагнитной восприимчивости настолько повышается, что можно значительно снизить необходимую для переориентации бицелл концентрацию ионов РЗЭ. Возможность за счет добавления парамагнитных ионов вызвать сильные изменения в характере ориентации бицелл, а следовательно и биомолекул, привлекательна еще и тем, что относительно легко удастся получить второй набор КДВ. Благодаря новому набору число измеряемых КДВ фактически удваивается, что существенно повышает как точность определяемой структуры, так и устраняет неоднозначность определения параметров порядка (см. ниже).

Если вместо нелипидных амфифильных ароматических соединений или парамагнитных ионов добавить фосфолипиды, содержащие, например, бифенильную группу²⁰³ в одной из длинных цепей, то можно создать бицеллярные системы с положительной анизотропией магнитной восприимчивости ($\Delta\chi$).^{211, 212}

Исследование ряда гидрофобных мембранных белков в растворе стало возможным благодаря использованию эффекта связывания ионов РЗЭ с мицеллами, содержащими белки.²¹³ Использование для этих целей бицелл, мембранных фрагментов и вирусов проблематично, поскольку мембранные белки, взаимодействуя с липидами этих частиц, сильно изменяют их строение. Это отражается на качестве спектров ЯМР.

в. Мембранные фрагменты

Способ упорядочения водорастворимых биомолекул в присутствии мембранных фрагментов был предложен почти одновременно авторами работ^{214, 215}. Мембранные фрагменты получают из галобактерий, которые в водном растворе с концентрацией $1–10 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ образуют широкие дископодобные частицы, состоящие из бактериородопсина и некоторых остаточных липидов. Эти частицы стабильны при значительных изменениях температуры, pH и ионной силы раствора. Они обладают большими отрицательными

зарядами и поэтому способны индуцировать ориентацию биомолекул (за счет электростатического взаимодействия), которой можно управлять, изменяя концентрации мембранных фрагментов или добавляя катионы для уменьшения электростатического взаимодействия между макромолекулой и мембраной.²¹⁵ Такие системы чрезвычайно устойчивы к вариациям температуры или pH и являются отличной альтернативой бицеллам.

Индукционное мембранными фрагментами упорядочение биомолекул было продемонстрировано на двух белках — убиквитине человека и р53. Максимальные значения КДВ $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ составили ~ 20 Гц. Следует отметить, что аксиальная и ромбическая компоненты и направление главной оси тензора упорядочения и в этом случае также сильно отличаются от соответствующих величин в бицеллах и других ориентирующих средах, что делает мембранные фрагменты удобной средой для определения дополнительного набора КДВ. Наличие нескольких наборов КДВ с направлениями главных осей соответствующих диагонализированных тензоров под сильно различающимися углами позволяет построить систему полной «триангуляции» биологических макромолекул в растворе (см. ниже).

Раствор мембранных фрагментов не жидкокристаллический. Диаметр типичных мембранных фрагментов составляет несколько микрометров, а толщина — 45 \AA . Их упорядочение в магнитном поле происходит благодаря семи α -спиралям бактериородопсина. В магнитном поле мембранные фрагменты упорядочиваются так, чтобы направление нормали мембраны было параллельно направлению магнитного поля, причем благодаря высокой концентрации бактериородопсина степень упорядочения чрезвычайно высока.²¹⁴

Минимальное значение концентрации жидких кристаллов в растворе не может быть меньше значения, при котором происходит образование ЖК-фазы, в отличие от этого концентрация упорядочивающих частиц в суспензии может быть сколь угодно низкой. Для мониторинга упорядочения можно использовать квадрупольное расщепление дейтерия в спектре тяжелой воды.

Использование ионов РЗЭ, как и в случае бицелл, позволяет изменить направление преимущественной ориентации исследуемых биомолекул в присутствии мембранных фрагментов.²¹⁶ При исследовании структуры мембранного белка авторам работы²¹⁷ в качестве парамагнитного зонда удалось использовать молекулу кислорода.

6. Ориентация стержнеподобными частицами

Следует иметь в виду, что бицеллы стабильны лишь в узком диапазоне температур и pH (при выходе из этого диапазона возможен гидролиз эфирной связи), а многие белки при взаимодействии с мембранами бицелл разрушают их. Поэтому для ориентации макромолекул предпочтительнее иметь дело с растворами более стабильных частиц, способных ориентироваться и ориентировать растворенные в них биомолекулы, не нарушая их строения. Такими частицами могут быть любые жесткие, заряженные стержнеподобные макромолекулярные ансамбли, состоящие, например, из палочкообразных вирусов и фагов из семейства нитевидных фагов, неорганических нитевидных кристаллитов, полимерных кристаллитов и других достаточно жестких нитевидных полимерных образований (например таких как, политетрафторэтиленовые усы).

а. Жидкокристаллические коллоидные суспензии стержнеобразных вирусов

В качестве альтернативы бицеллам одними из первых были предложены широко известные суспензии бактериофага fd и

вируса табачной мозаики,²⁰² бактериофага Pf₁ или M13.²¹⁸ Такие системы очень удобны для получения средних значений степени ориентированности растворенных биомолекул, причем имеется возможность управлять параметрами ориентированности путем добавления магнитно упорядочиваемого бактериофага Pf₁.^{218, 219} Такая методика была использована для определения КДВ $^1\text{H}-^1\text{H}$, $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ и $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ различных белков и олигосахаридов. Ориентация тензора молекулярного упорядочения в таких системах значительно отличается от ориентации в среде обычных бицелл, что позволяет проводить исследования в обеих средах одновременно.

Методика приготовления препарата бактериофага Pf₁ для частичного упорядочения биомолекул подробно описана в работах^{220–222}. Бактериофаг Pf₁ — это ДНК-фаг, состоящий из 7349 нуклеотидов, упакованный в белковую оболочку, с отношением нуклеотид : белок, равным 1 : 1. Он представляет собой стержнеобразную систему длиной $20\,000 \text{ \AA}$ и диаметром 60 \AA , которая спонтанно ориентируется в магнитном поле; Pf₁ имеет отрицательный поверхностный заряд. На примерах ДНК и РНК подробно рассмотрены ориентирующие свойства фага в разных экспериментальных условиях. По квадрупольному расщеплению дейтерия можно судить о степени упорядочения системы, которую можно изменять, варьируя концентрацию фагов и температуру.²²⁰ Авторы рекомендуют pH среды 6.5–8.0 и $[\text{NaCl}] < 100 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$.

Большинство биомолекул и ориентирующих частиц заряжены и при подборе соответствующей среды необходимо это учитывать. Бактериофаги представляют собой идеальную среду для ориентации молекул РНК и ДНК: отрицательно заряженные молекулы нуклеиновых кислот упорядочиваются за счет стерических взаимодействий с отрицательно заряженными фагами Pf₁, которые продуцируют стабильную ориентацию в широкой области условий раствора.

Использование отрицательно заряженных частиц для ориентирования положительно заряженных биомолекул проблематично, хотя в ряде случаев такая среда оказывается очень удобной и для исследования белков.²²⁰ Даже при аномально малых концентрациях бактериофага рассматриваемые системы эффективны.²²³ Предполагается, что в этом случае реализуется другой механизм ориентации, обусловленный слабым связыванием исследуемого белка с фагом. Наблюдаемая ориентация является результатом быстрого обмена между связанным и свободным состояниями белка.

В холестерической фазе бактериофага fd степень упорядоченности растворенного белка и, что особенно важно, ромбичность зависят от pH.²²⁴ Значение pH можно варьировать в широких пределах — от 2 до 8 (устоялось ошибочное мнение, что с фагами можно работать лишь при высоких pH).

Упорядоченность ЖК-системы на основе фагов можно зафиксировать и сделать независимой от внешнего магнитного поля. Для этого систему помещают в полиакриламидную матрицу. Система, стабилизированная полимером, полностью сохраняет свои специфические ориентационные характеристики.²²⁵

б. Кристаллиты целлюлозы

Суспензии кристаллитов целлюлозы, наверное, самые дешевые, стабильные и простые среды для ориентации биомолекул.²²⁶ Изготавливают их из природных целлюлозных волокон (например, из фильтровальной бумаги) путем осторожного гидролиза серной кислотой, концентрирования и экстенсивного диализа. После выстаивания система расслаивается на верхнюю изотропную и нижнюю анизотропную фазы. Последнюю извлекают, концентрируют выпариванием и используют.

Кристаллиты целлюлозы представляют собой стержни размерами $\sim 200 \times 10$ нм. Отдельный кристаллит обладает большой отрицательной диамагнитной анизотропией, поэтому в магнитном поле он ориентируется длинной осью перпендикулярно направлению приложенного поля. Процесс ориентации происходит медленно; для достижения полной ориентации необходимо свежеприготовленный образец выдерживать несколько часов в магнитном поле. Поверхностный отрицательный заряд кристаллита, обусловленный сульфатными группами, меньше, чем поверхностный заряд бактериофагов, поэтому они ориентируют биомолекулы больше по стерическому механизму, чем по электростатическому.

7. Растянутые полимерные гели

Полимерные гели — перспективная среда для ориентации биомолекул. Эффект ориентации малых молекул, включенных в резиноподобные полимеры, при растяжении последних был известен давно.²²⁷ Две группы исследователей независимо друг от друга предложили использовать это явление для ориентации биомолекул в полиакриламидных гелях. Ориентация достигается либо при механическом действии (сжатие или растяжение),^{228, 229} либо при помощи встроенных в гель ориентированных мембранных фрагментов и других частиц.²²⁹

Гель получают полимеризацией водного раствора смеси акриламида и метиленабисакриламида в специальной трубке диаметром, немного отличающимся от диаметра ампулы, используемой в экспериментах ЯМР. Инициатором полимеризации служит смесь персульфата аммония с тетраметилэтилендиамином. После полимеризации гель тщательно промывают и высушивают, затем помещают в ампулу ЯМР и заливают водным раствором исследуемого белка. Белок и вода медленно диффундируют в гель, который набухает. Далее гель подвергается механическому воздействию, в результате чего происходит ориентация проникших в гель макромолекул. Если первоначальный диаметр трубки, в которой был приготовлен гель, меньше диаметра ампулы, используемой в экспериментах ЯМР, гель сжимается, если же наоборот, — растягивается, при этом ориентация оси тензора упорядочения биомолекул, включенных в гель, устанавливается соответственно поперек или вдоль оси ампулы.

Размеры пор и диффузионные свойства полиакриламидных гелей можно менять, регулируя концентрацию акриламида и метиленабисакриламида. Вместо простой системы белок–вода можно использовать мицеллярные системы белок–ПАВ–вода.

Еще один вариант — включение в гель при полимеризации других частиц, например мембранных фрагментов, фагов, вирусов, способных ориентировать белковые молекулы. Полимеризацию проводят в магнитном поле, чтобы указанные частицы включались в гель в ориентированном состоянии. Ориентация молекул вводимого в гель белка происходит за счет взаимодействия с ориентированными (ориентирующими) частицами.

Для ориентирования иммобилизуемых в гель частиц при полимеризации можно использовать другие внешние макроскопические воздействия, например электрические или механические.

Отличительной особенностью полимерных гелей является независимость от магнитного поля направления их ориентации, которое определяется методикой приготовления геля. Это позволяет плавно менять ориентацию геля относительно направления магнитного поля. Данную особенность можно использовать и для придания системе после завершения измерений ЯМР новой, двуслойной ориентации. В такой аксиально несимметричной среде можно определить

набор ориентационно-зависимых параметров, который не удастся получить в обычных одноосных ЖК-средах.²²⁸ Ориентация в таких системах не нарушается и при вращении образца. Это позволяет измерять КССВ при вращении образца под магическим углом (для обнуления КДВ).²²⁵

Изменяя давление, концентрацию полиакриламида или плотность поперечных связей в геле, можно в широких пределах изменять степень ориентированности биомолекул, в то время как направление тензора ориентации и его асимметрия меняться практически не будут.²³⁰ В гелях можно исследовать и относительно большие молекулы белков, поскольку времена релаксации в геле для них достаточно велики.

Для равномерного сдавливания полиакриламидного гидрогеля предложено простое воронкообразное устройство.²³¹ Степень ориентирования зависит от отношения диаметров цилиндрического образца гидрогеля до и после сжатия.

8. Минеральные жидкие кристаллы

Рассмотренные выше среды для ориентирования биомолекул органического происхождения, поэтому в спектрах ЯМР сигналы растворителя доминируют, поскольку число молекул среды намного больше числа исследуемых биомолекул. Это создает определенные трудности, особенно при исследовании олигосахаридов или олигонуклеотидов, для которых синтез изотопно-обогащенных аналогов очень сложен и дорог.

В этом отношении чрезвычайно удобны минеральные жидкие кристаллы, не содержащие ядер ^1H и ^{13}C . Систематически такие кристаллы начали исследовать не так давно. Это коллоидные системы, состоящие из сильно анизотропных лентовидных, пластинчатых, дискообразных или стержнеобразных наночастиц, которые способны спонтанно образовывать различные типы ЖК-фаз. Особый интерес для спектроскопии ЯМР представляют системы, ориентирующиеся под действием магнитного поля.

Одна из таких систем — водная суспензия пентаоксида ванадия V_2O_5 , в которой в определенном диапазоне концентрации и pH формируется нематическая фаза.²³² Частицы этой фазы представляют собой длинные (несколько сотен нанометров) ленты толщиной 1 нм и шириной 25 нм. Механизм ориентации биомолекул из-за высокого отрицательного заряда частиц похож на механизм, реализуемый в суспензиях вирусов и фагов. Предложен и другой класс хорошо ориентирующихся в магнитном поле минеральных жидких кристаллов — ряд набухающих гелей солей твердых кислот с общей формулой $\text{H}_n\text{M}_n\text{Z}_n\text{O}_{3n+5}$ ($\text{M} = \text{Sb}, \text{Nb}, \text{Ta}$; $\text{Z} = \text{P}, \text{As}$; $n = 1, 3$), частицы которых имеют пластинчатую форму.²³³

Константы дипольного взаимодействия ^{13}C – ^1H пентасахарида Lewis X, измеренные в этих системах, при естественном содержании изотопа ^{13}C , оказались по порядку величины сравнимыми с КДВ, измеренными в органических ЖК, в частности, в бицеллярной среде.

Преимуществами неорганических систем по сравнению с органическими являются их высокая стабильность и инертность в широком диапазоне температур, возможность извлечения исследуемого вещества флокуляцией, а также то, что при более низких концентрациях они ориентируются в магнитном поле намного лучше и быстрее.

К сожалению, ни одна из рассмотренных выше систем не является универсальной для структурных исследований.¹⁷² Бицеллярная система DMPC/DHPC подвержена необратимой деградации из-за гидролиза при низких pH.¹⁸⁸ Система DIODPC/CHAPSO более стабильна при низких pH, но не образует ЖК-фазы в нейтральной среде.¹⁹⁴ Система цетилпиридинийхлорид/гексанол дестабилизируется при высоких

концентрациях белка, и для повышения ее стабильности необходимы высокие концентрации соли,¹⁷⁰ а композиция цетилпиридинийбромид/гексанол, наоборот, стабильная при низких значениях ионной силы раствора.¹⁷¹ Фаги хорошо «работают» в нейтральных средах, но при $pH < 6$ имеют тенденцию агрегироваться.²¹⁸ Мембранные фрагменты и бицеллы часто связывают белки слишком сильно, что проявляется в уширениях линий в спектрах ЯМР и возмущении тензора ориентации, вследствие чего уже нельзя определить реальную структуру молекулы в растворе.^{214, 215}

V. Измерение ориентационно-зависимых параметров

1. Ориентационно-зависимые параметры

В настоящее время в экспериментах можно измерять ряд параметров ЯМР, содержащих разнообразную структурную информацию об исследуемых молекулах. В табл. 1 приведены некоторые из таких параметров. Наиболее полную и разнообразную структурную информацию содержат ориентационно-зависимые параметры, такие как КДВ константы квадрупольного взаимодействия (ККВ) и анизотропии химических сдвигов.

Константы дипольного взаимодействия оказались более полезными на всех этапах процедуры определения структуры биомолекул, чем традиционные параметры, получаемые в основном в экспериментах на основе ЯЭО. Сравнение расстояний, определенных в таких экспериментах и найденных с помощью КДВ, показало преимущество использования последних. Расстояния свыше 5–6 Å для методик на основе ЯЭО недоступны, тогда как при помощи КДВ можно определять и большие расстояния.

Принципиальное различие рассматриваемых методов следующее: с помощью сигналов ЯЭО можно оценивать длину вектора, соединяющего взаимодействующие ядра, а КДВ помимо этого дают информацию еще и об ориентации данного вектора относительно направления магнитного поля, что позволяет определять относительную пространственную ориентацию отдаленных частей молекулы.

Другое принципиальное отличие — разная зависимость измеряемых параметров от расстояния. Дипольные взаимодействия зависят от расстояния как $1/r^3$, а сигналы ЯЭО — как $1/r^6$. На слабее спадающей зависимости от расстояния можно выделить участки, соответствующие взаимодействиям между более удаленными ядрами.

Даже если число сигналов ЯЭО велико, применение КДВ значительно повышает точность определения структуры. Если же количество информации, полученной из сигналов

ЯЭО, мало, как это имеет место при исследованиях нуклеиновых кислот или больших, частично дейтерированных (для упрощения спектра) молекул белков, КДВ могут играть определяющую роль.²³⁴

Чтобы определить ориентационно-зависимые параметры, необходимо измерить спектры ЯМР как в изотропном, так и в ориентированном состояниях. Возможны две принципиально разные схемы этих измерений, каждая из которых имеет свои достоинства и недостатки:

— отдельные измерения (изотропные и анизотропные параметры измеряют в разных экспериментах, соответствующих изотропным и ориентированным состояниям);

— одновременные измерения (изотропные и анизотропные параметры измеряют в одном корреляционном эксперименте).

Вплоть до настоящего времени в основном проводили отдельные измерения в изотропном и ориентированном состояниях. В таких экспериментах можно подобрать для каждого из состояний наиболее оптимальные условия регистрации спектров: среду, концентрацию, температуру и т.п. Однако в разных экспериментальных условиях структура исследуемой биомолекулы может быть разной. Кроме того, для таких измерений часто требуются большие количества исследуемых веществ, поскольку неразрушающий перенос биомолекул из одной среды в другую очень сложен. Еще одна проблема — трудность отнесения сигналов из-за зависимости химических сдвигов и их анизотропий от условий экспериментов.

Отмеченных недостатков лишены методы, основанные на одновременных измерениях изотропных и анизотропных параметров. Измерения проводят в различного рода многомерных корреляционных экспериментах, на одном из этапов (эволюция/регистрация) которых ориентационно-зависимые параметры не усреднены до нуля.

Это может быть реализовано, например, в эксперименте типа COSY двумя способами. Если в исходном образце имеются анизотропные взаимодействия, то их на одном из этапов корреляционного эксперимента временно устраняют путем реального (или в спиновом пространстве) вращения под магическим углом. Если же исходный образец изотропен, то анизотропные взаимодействия наводят воздействием некоего ориентирующего фактора.

Эта идея была высказана сравнительно давно, однако разработаны только эксперименты с использованием вращений под магическим углом. В настоящее время весьма актуальны эксперименты другого типа, связанные с быстрыми управляемыми процессами ориентирования/деориентирования молекул. Об одном из них, с использованием ориентирования под действием электрического поля,^{165–167} упоминалось выше.

Следует отметить, что исследования методом ЯМР ориентированных биомолекул часто предваряли традиционными экспериментами в изотропных средах. Во многих случаях это необходимый этап, так как отсутствуют достаточно четкие методики ЯМР с использованием ориентирующих сред. Особенно это касается стадии идентификации резонансных сигналов первичной последовательности. Однако выявилась и другая тенденция: сделать спектроскопию ЯМР ориентированных молекул самодостаточной, т.е. разработать метод, который позволил бы определить структуру биомолекулы на основе лишь измерений в ориентированной фазе.⁴⁶ Однако мы склонны считать, что оба типа проводимых экспериментов — в ориентированном и изотропном состояниях — дополняют друг друга.

Ниже обсуждены эксперименты, в которых регистрировали спектры ЯМР слабо ориентированных биомолекул, причем особое внимание уделено методам, специфичным именно для таких молекул. В зависимости от измеряемой

Таблица 1. Параметры ЯМР, содержащие структурную информацию.

Параметр ЯМР	Структурная информация
Химические сдвиги 1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P	Отнесение сигналов, вторичная структура, торсионные углы
Константы 3J	Торсионные углы
Сигналы ЯЭО	Межпротонные расстояния ($< 5 \text{ Å}$)
Релаксационные параметры	Торсионные углы, ориентация связи, динамика
КДВ	Ориентация связи, межъядерные расстояния, углы, динамика
АХС	Ориентация связи или функциональной группы
ККВ	Расстояния, углы, ориентация связи, динамика

величины условно можно выделить следующие эксперименты: с измерением КДВ; с измерением АХС; с измерением ККВ.

2. Определение остаточных констант дипольных взаимодействий

Именно возможность измерения КДВ для биомолекул обусловила интерес к спектроскопии ЯМР слабо ориентированных систем.^{47, 235}

Слабые ориентационные вклады в измеряемых КССВ проще всего выделить для непосредственно связанных ядер, расстояния между которыми наименьшие и, следовательно, дипольные вклады наибольшие. У биомолекул такими парами ядер могут быть Н–С, Н–N, С–С, С–N. Однако из-за низкого естественного содержания нужных магнитных изотопов этих ядер необходимо использовать изотопно-обогащенные образцы.

Для определения КДВ можно применять практически все типы разработанных к настоящему времени методик точных измерений КССВ. В первую очередь, это эксперименты на основе E COSY (Exclusive COSY) и *J*-корреляций, а также их разных модификаций.

Как правило, КДВ определяют в двумерных или псевдодвумерных экспериментах по разности расщеплений скалярной константы *J* в изотропной и в ориентированной фазах. В случае больших молекул белков, когда анализ результатов двумерных экспериментов затруднен (особенно если белки содержат преимущественно α -спирали), проводят трехмерные эксперименты ЯМР.

В принципе дипольные константы могут быть измерены между любой парой магнитных ядер, связанных значимым взаимодействием, но на практике обычно довольствуются лишь несколькими парами.

Первыми стали использовать КДВ между прямо связанными ядрами ^1H – ^{13}C и ^1H – ^{15}N .^{45, 141} В настоящее время КДВ между такими ядрами составляют основной массив измеряемых величин в спектроскопии ЯМР слабо ориентированных биомолекул. В структурных исследованиях их интерпретация проста, поскольку расстояния между прямо связанными ядрами в биомолекулах хорошо известны и практически постоянны. Это позволяет однозначно определять ориентацию вектора связи относительно направления магнитного поля. В $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -обогащенных белках можно найти вектор связи практически для всех возможных пар взаимодействующих ядер (за исключением ядра кислорода). Во многих случаях этой информации, которая может быть дополнена информацией, полученной в традиционных экспериментах с изотропным состоянием, достаточно для значительного повышения точности расчетов структуры.

Хотя каждая такая КДВ определяет ориентацию вектора связи одной пары ядер, полная структура биомолекулы останется неопределенной, сколько бы констант не находили, потому что они не содержат трансляционной информации.

Следующим шагом было использование КДВ ^1H – ^1H .^{218, 219} В отличие от КДВ гетероядерных пар ^1H – ^{13}C и ^1H – ^{15}N , определяющих ориентацию соединяющих эти ядра векторов, КДВ пары ^1H – ^1H содержат информацию и о расстояниях между ядрами (до 7.4 Å).²¹⁹

При наличии скалярных и остаточных дипольных взаимодействий эффективность переноса в разных типах гомоядерного смешивания (изотропного или дипольного) сильно зависит от относительных значений констант.^{236–238} В общем случае для эффективного переноса при всех возможных относительных значениях косвенных и дипольных констант требуются две различные смешивающиеся последовательности (Хартмана–Хана и COSY).²³⁹

В настоящее время при типовом исследовании биомолекулы методами спектроскопии ЯМР проводят множество разнотипных экспериментов для измерения КДВ между непосредственно связанными и удаленными ядрами. Совершенствуют методики измерения КДВ за счет подключения новых ядер, например ^{19}F (см.²⁴⁰). Разработанная недавно методология увеличения разрешения и повышения чувствительности TROSY была сразу же использована в экспериментах по определению КДВ,²⁴¹ в частности, в экспериментах типа HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence),²⁴² HNCO (3D H^{N} , N, C' Heteronuclear Correlation Experiment),^{243, 244} HN(CO)CA (3D H^{N} , C', C'' Heteronuclear Correlation Experiment)²⁴⁵ и др.

Предложены методики измерения малых скалярных взаимодействий и дипольных констант в пуриновых или пиримидиновых основаниях в нуклеиновых кислотах,^{246, 247} а также детектирования межнуклеотидных дипольных взаимодействий.²⁴⁸

а. Константы дипольных взаимодействий между ядрами, разделенными одной связью

К настоящему времени разработано множество эффективных методик измерения КДВ между ядрами, разделенными одной связью, которые были успешно использованы на модельных белках, в основном убиквитине. Особенности применения этих методик к конкретным парам прямо связанных ядер в биомолекуле подробно рассмотрены в ряде работ. В белках — это КДВ пар N– H^{N} (см.^{140, 241–243, 249–257}), C^{α} – H^{α} (см.^{177, 251, 253, 258–261}), C^{α} –C' (см.^{241–245, 253, 259, 261, 262}), C^{α} –N (см.^{241, 244, 252, 253, 255, 263}) и C'–N (см.^{241, 243, 244, 257}) основной цепи, а также пар C $^{\beta}$ –H $^{\beta}$ (см.^{259, 260, 264}), C^{α} –C $^{\beta}$ (см.^{244, 245, 259}), C $^{\text{Me}}$ –C и C $^{\text{Me}}$ –H боковых цепей.^{265, 266} Многие методики применимы для измерения разных типов констант, а некоторые позволяют одновременно измерять несколько разных констант.^{252, 253} Разрабатываются и специальные методики для измерения констант, характеризующих определенные группы, например, NH_2 -группы аспарагина и глутамина в боковых цепях.²⁶⁷

Прямые КДВ в белках интерпретируют как величины, определяющие направление вектора соответствующей связи, длину которой считают постоянной. В частности, длина C–H составляет 1.095, N–H — 1.02, C^{α} –C' — 1.525, C–C — 1.517, N–C $^{\alpha}$ — 1.329, N–C' — 1.45 Å.

Для ^{15}N -обогащенных РНК и ДНК можно определить лишь ограниченное число КДВ ^1H – ^{15}N , поскольку протоны иминных групп обычно находятся в состоянии быстрого обмена. Поэтому удобнее использовать КДВ ^1H – ^{13}C в обычных или ^{13}C -обогащенных образцах.²⁶⁸ Некоторые резонансные сигналы C–H нуклеиновых кислот даже в двумерных спектрах сильно перекрываются, для их разрешения разработаны специальные трехмерные эксперименты.²⁶⁹

Авторами работы²⁵¹ предложена элегантная методика E COSY типа S 3 E (Spin State Selective Excitation), названная IPAP (In-Phase/Anti-Phase). Эта методика успешно применена в ^1H -связанных экспериментах [^{15}N , ^1H]-HSQC и HN(CO), что позволило записать дополняющие друг друга софазные и антифазные *J*-связанные спектры ЯМР. Сумма и разность этих спектров содержат только сильнополюсную или слабополюсную компоненты дублетов, поэтому в случае их перекрывания возможно измерение *J*-расщеплений, при этом разрешение по сравнению с развязанным спектром не ухудшается.

В большинстве исследований разные константы измеряют в разных экспериментах. Однако многие образцы нестабильны, да и ориентированность молекул в них меняется. Поэтому были разработаны трехмерные мето-

дики, позволяющие одновременно измерять несколько разнотипных КДВ в одном эксперименте.²⁷⁰

Оттигер и Бакс²⁵³ одновременно измерили четыре разнотипные КДВ между прямо связанными ядрами основной цепи молекулы $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -обогащенного убиквитина. Найденные значения хорошо согласовывались, особенно КДВ $\text{N}-\text{C}'$ и $\text{C}\alpha-\text{C}'$, и расстояния, определенные с их помощью, совпали с данными РСА, а расстояния $\text{N}-\text{H}^{\text{N}}$ и $\text{C}\alpha-\text{H}^{\text{N}}$ оказались немного больше. Авторы связали это с колебательными движениями, амплитуды которых значительно больше, чем амплитуды колебаний $\text{N}-\text{C}'$ и $\text{C}\alpha-\text{C}'$.

Для подавления $^1\text{H}-^1\text{H}$ -взаимодействий, приводящих к уширению линий в спектрах ориентированных образцов, можно использовать адиабатическую селективную по ^1H гомоядерную развязку,²⁵⁴ либо частичное дейтерирование.

Некоторые трудности возникли при измерениях КДВ $\text{C}'-\text{N}$ из-за малых значений гиромагнитных отношений ядер азота и углерода, а также большего расстояния $\text{C}'-\text{N}$, равного 1.33 Å. Значение $D_{\text{C}'\text{N}}$ в 8,3 раза меньше, чем D_{NH} . Поэтому точность определения $D_{\text{C}'\text{N}}$ данным методом можно считать критически низкой.²⁵³

Обычно константу $D_{\text{C}'\text{N}}$ определяют по разности расщепления $^1J_{\text{C}'\text{N}}$ в изотропной и ориентированной фазах либо из софазных расщеплений в $^{13}\text{C}'$ -связанных спектрах HSQC (или TROSY),^{252, 253} либо из антифазных расщеплений в $^{13}\text{C}'$ -связанных спектрах TROSY-HNCO.²⁵⁵ Однако из-за недостаточной разрешенности многих из дублетов $^{15}\text{N}-\{^{13}\text{C}'\}$ их расщепления не удастся измерить с требуемой точностью. Для решения этой проблемы Перми и Аннила²⁴¹ предложили выводить компоненты дублета в двух разных субспектрах (подобно тому, как это предусмотрено в описанных выше методиках IPAP и S^3E).²⁵¹

В работе²⁶³ предложен другой, более простой метод решения проблемы точного измерения расщеплений в плохо разрешенных мультиплетах, основанный на принципах J -корреляционной спектроскопии. В соответствии с данным методом величину взаимодействия определяют из отношения амплитуд двух резонансов, а не из разности резонансных частот. Для этого находят относительные интенсивности сигналов в двух трехмерных спектрах TROSY-HNCO с разными дефазировочными интервалами $^1J_{\text{C}'\text{N}}$, равными $1/2^1J_{\text{C}'\text{N}}$ и $1/1^1J_{\text{C}'\text{N}}$. Авторы предложили и другой, может быть, более простой, метод регистрации двух спектров СТ TROSY (Constant Time TROSY) $^{15}\text{N}-^1\text{H}$: с $^{13}\text{C}'$ -развязкой или со 180° -градусным импульсом на частоте $^{13}\text{C}'$, прикладываемым одновременно со сдвинутым на 180° ^{15}N -импульсом.

Еще один вариант эксперимента HNCA-TROSY вместе с возможностью измерения скалярных и дипольных констант позволяет проводить отнесение сигналов атомов вдоль цепи биомолекулы.²⁷¹

Для быстрого определения знака КДВ $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ предложена методика вращения образца под различными углами.²⁷²

б. Константы дипольных взаимодействий между ядрами, разделенными несколькими связями

Во всех рассмотренных выше экспериментах можно определить лишь КДВ прямо связанных ядер. Измерение гомоядерных и гетероядерных КДВ через несколько связей затруднено не только из-за их меньших значений, но и из-за меньших значений КССВ.²⁷³ Тем не менее авторы ряда работ применяют для этой цели методики измерения КДВ прямо связанных ядер. В частности, разработаны методики определения КДВ $\text{C}'-\text{H}^{\text{N}}$ (см.^{241, 243, 252, 257, 274}), $\text{C}\alpha-\text{H}^{\text{N}}$ (см.^{241, 243, 244, 274}), $\text{N}-\text{C}\alpha$ (см.^{241, 244, 274}), $\text{N}-\text{C}'$ ^{243, 252, 274} $\text{C}\alpha-\text{C}'$ ^{243, 274} а также КДВ $\text{H}^{\text{B}}-\text{H}^{\text{N}}$ и $\text{H}^{\text{N}}-\text{H}^{\text{N}}$ в боковых цепях^{264, 274, 275} и КДВ $\text{H}-\text{H}$ в метильных группах.²⁶⁵

Описаны двумерные двух- и нуль-квантовые эксперименты для измерения геминальных КССВ и КДВ в группах NH_2 и CH_2 белков, а также для определения знаков этих констант.²⁷⁴

Винциальные КДВ в белках измеряли в основном для пар $\text{H}^{\alpha}-\text{H}^{\text{N}}$, $\text{C}\alpha-\text{H}^{\text{N}}$, $\text{C}\gamma-\text{H}^{\text{N}}$ и $\text{C}\delta-\text{H}^{\text{N}}$ (см.^{244, 276}). Для измерения винциальных КДВ $^1\text{H}3'-^{31}\text{P}$ нуклеиновых кислот разработаны методы специальной J -корреляционной двумерной спектроскопии,²⁷⁷ а также новая методология типа СТ COSY (Constant Time COSY).²⁷⁸

Далее мы более подробно рассмотрим работы, посвященные измерению винциальных КДВ $^1\text{H}-^1\text{H}$.

Использование описанных выше методик измерения КДВ прямо связанных ядер в случае взаимодействия $^1\text{H}-^1\text{H}$ затруднено из-за малых значений сопутствующих J -констант. Тем не менее разработано множество методов измерения таких КДВ в перекрывающихся мультиплетах, так как именно с их помощью можно определять большие расстояния, чем это позволяют методы на основе ЯЭО.²¹⁹ На базе импульсной последовательности типа TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) был предложен специальный двумерный эксперимент, названный DCOSY (Dipolar Coupling Spectroscopy), основанный на зависимости интенсивности прямого кросс-пика от значения КДВ. Предложенная методика позволяет также отделить и проявляющиеся в спектрах обычные кросс-пики от пиков релейной передачи когерентности, поскольку они имеют другой знак. Проблема возникает при наложении кросс-пиков этих двух типов из-за невозможности деконволюции сигнала, что ограничивает возможности эксперимента.

Для устранения множественных релейных кросс-пиков предложен другой простой метод оценки значений КДВ $^1\text{H}-^1\text{H}$, основанный на анализе интенсивностей диагональных и кросс-пиков в экспериментах СТ COSY.²⁷⁹ Однако поскольку кросс-пики в таком эксперименте антифазны или сдвинуты по фазе, то часто возникают трудности с их интегрированием. Поэтому был разработан трехмерный вариант метода с дополнительным ^{15}N -редактированием,²⁸⁰ чувствительность которого не уступает чувствительности метода на основе ЯЭО. Другой способ определения КДВ $^1\text{H}-^1\text{H}$ в экспериментах СТ COSY основан на зависимости условий зануления межпротонных кросс-пиков от времени.²⁸¹

Наряду с методами, основанными на оценке интенсивностей кросс-пиков, разработаны и специальные методы прямого определения знака и абсолютных величин КДВ $^1\text{H}-^1\text{H}$ по измерениям расщеплений в спектрах.^{274, 282}

Разработан²⁸² эксперимент типа HNCA с наблюдением E COSY между протонами H^{N} и H^{α} . К сожалению, метод применим для точного определения величин и знаков КДВ только между H^{N} и H^{α} .

Пети и Гринингер²⁸³ развили этот метод в трехмерный, включив в него этап NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy). Их метод JHN NOESY (J_{HN} -Based NOESY) требует минимального изотопного обогащения и для дальнейшего повышения разрешения спектров может быть комбинирован с элементами методики S^3E .

Достоинством другого трехмерного эксперимента HNHA, разработанного для измерений неразрешенных КДВ между протонами амидных групп и другими протонами в молекулах ^{15}N -обогащенных белков является возможность использования подавления гомоядерного воздействия и методики TROSY, что позволяет исследовать большие ориентированные белки.²⁸⁴ Еще один простой и надежный метод измерения межпротонных КДВ в спектрах с неразрешенными, но не очень большими мультиплетами, основан на итеративном анализе формы мультиплетов в фазочувствительных спектрах COSY.²⁸⁵

Знаки КДВ $^1\text{H}-^1\text{H}$ зависят от ориентации межпротонного вектора по отношению к внешнему магнитному полю и их определение часто затруднено, особенно если отсутствует скалярное взаимодействие между протонами или они не имеют общего партнера по связям. Поэтому был разработан очень удобный эксперимент типа $J\text{HN TOCSY}$ ($J\text{HN}$ -Based TOCSY), названный «знаковый» COSY.²⁸⁶ Он позволяет определять знак КДВ $^1\text{H}-^1\text{H}$ относительно знака константы прямого взаимодействия $^1\text{H}-\text{X}$ в линейных трехспиновых системах $\text{X}-^1\text{H}-^1\text{H}$ ($\text{X} = ^{13}\text{C}$ или ^{15}N). Достоинства данного метода — высокая чувствительность и возможность подавления диагональных пиков, причем кросс-пики наблюдаются только между непосредственно взаимодействующими протонами.

Недавно неожиданно выяснилось, что знаки и величины КДВ $\text{H}^{\text{N}}-\text{H}^{\alpha}$ можно определить даже в обычном гомоядерном эксперименте COSY.²⁸⁷ Оказалось, что в нем проявляются лишь КДВ с положительным знаком, а кросс-пики, соответствующие отрицательным КДВ, либо не проявляются, либо очень уширены и легко диагностируются.

3. Измерение анизотропии химических сдвигов

Химический сдвиг — тензорная величина. Он анизотропен; в изотропной жидкости наблюдают только его усредненное значение. При исследовании монокристалла все шесть компонент симметричного тензора могут быть найдены экспериментально путем измерения их величин вдоль направлений главных осей кристалла. Для порошкообразного образца можно определить лишь диагональные элементы. Однако из-за сильного уширения линий в спектрах ЯМР твердых образцов точность таких измерений мала. Жидкие кристаллы в этом плане имеют определенное преимущество, хотя удается определять лишь линейную комбинацию диагональных элементов.

Анизотропия химического сдвига $\Delta\delta$ для каждого ядра при переходе из изотропного в ориентированное состояние определяется по формуле

$$\Delta\delta = \sum_i \sum_j A_{ij} \delta_{ii} \cos^2 \theta_{ij},$$

где θ_{ij} — угол между главной осью тензора химического сдвига δ_{ii} и главной осью диагонализированного тензора молекулярного упорядочения A_{ij} , суммирование проводят по всем i и j .

Величина $\Delta\delta$ — один из основных параметров при исследовании структуры биомолекул методами ЯМР твердого тела и в релаксационных измерениях при изучении динамики цепи. Корреляция между АХС и дипольным взаимодействием дает важную информацию об углах,⁶⁷ а также является ключевой в экспериментах TROSY.²⁶

Для ориентированных биомолекул можно непосредственно измерять $\Delta\delta$. В этом случае по изменению химического сдвига ядра при переходе биомолекул из изотропного состояния в ориентированное можно получить информацию об ориентации тензора АХС этого ядра относительно тензора молекулярного упорядочения.¹⁷⁵ Чтобы эту информацию можно было использовать, надо предварительно найти значения компонент тензора параметра порядка биомолекулы (которые можно определить, например, при помощи КДВ), а также значения главных компонент тензора АХС данного ядра (которые можно определить из твердотельных экспериментов или рассчитать, если структура исследуемого белка известна). Далее измеренные разности химических сдвигов изотропной и ориентированной молекул преобразуют в величины, описывающие ориентацию векторов пары связей относительно тензора параметра порядка. Например, для атомов $^{13}\text{C}'$ карбонильных групп в белках такой парой могут

служить векторы связей $\text{C}'-\text{O}$ и $\text{C}'-\text{N}$,²⁸⁸ а для атомов ^{31}P фосфатных групп нуклеиновых кислот — векторы связей $\text{P}-\text{O}(1)$ и $\text{P}-\text{O}(2)$.²⁸⁹

Первыми о возможности использовать в структурных исследованиях биомолекул наряду с КДВ и параметр АХС сообщили Тжандра и Бакс⁴⁵ и сами же экспериментально подтвердили эту возможность.¹⁴¹

По оценке авторов работы²⁹⁰ среднее значение $\Delta\delta$ для ядра ^{15}N амидной группы в молекулах белков составило -168 ± 20 м.д., а значение угла α между вектором связи $\text{N}-\text{H}$ и направлением главной оси тензора АХС ^{15}N — $13 \pm 5^\circ$. При более тщательном определении $\Delta\delta$ ^{15}N на примере молекулы лизоцима подтверждена правомочность использования средних значений $\Delta\delta$ и α в белках:²⁹¹ были найдены значения -171.5 ± 2.2 и $18.3 \pm 0.8^\circ$ соответственно.

Установлена корреляция между АХС $^{13}\text{C}^\alpha$ и элементами вторичной структуры биомолекулы.²⁹² Оказалось, что у атомов C^α значение $\Delta\delta$ в α -спиралях равно 6.1 ± 4.9 , а в β -листах 27.1 ± 4.3 м.д.

В работах^{288, 293} обоснована и разработана на примере АХС карбонильных групп (которые можно легко измерить) методика их включения в процедуру определения структуры. Оценено достигаемое при этом повышение точности структуры.

В серии работ Тжандра и Бакс с сотр. обосновали возможность включения подобной информации, а именно АХС атомов азота амидной группы,²⁹⁰ углерода C' карбонильной группы,²⁹³ а также C^α (см.²⁹²) и ^1HN (см.²⁹⁴), в стандартные процедуры определения структур биомолекул.

В последующих работах можно найти конкретные примеры использования АХС. Так, $\Delta\delta$ атома C' карбонильной группы использовано как граничное условие в широко известной программе XPLOR.²⁹⁵

В металлосодержащих белках из-за наличия парамагнитного центра²⁹⁶ появляются так называемые псевдоконтактные парамагнитные сдвиги, которые можно использовать как дополнительные ограничения на структуру. Такие ограничения учитывали при определении структур ряда биомолекул белков. Благодаря псевдоконтактным сдвигам можно точно установить положение иона металла в белке, а также определить компоненты тензора магнитной восприимчивости белка.^{158, 297}

4. Измерение констант квадрупольных взаимодействий

Ядра со спином $> 1/2$ обладают ядерным электрическим квадрупольным моментом и взаимодействуют с градиентом электрического поля. Это взаимодействие описывается тензором квадрупольного взаимодействия \mathbf{q} второго ранга. В спектрах ЯМР может проявляться его z -компонента, определяемая как

$$q_{izz} = \frac{eQ_i V_{izz}}{h},$$

где eQ_i — квадрупольный момент i -го ядра, V_{izz} — элемент тензора градиента электрического поля у i -го ядра.

Константа квадрупольного взаимодействия может быть найдена из расщепления линий в спектре ЯМР и значений параметра порядка молекулы в нематической фазе. Поскольку ККВ зависит только от электронных свойств основного состояния и ядерного электрического квадрупольного момента, то она содержит информацию об электронной структуре вокруг изучаемого ядра. Значения ККВ, найденные из наблюдаемого в нематической фазе квадрупольного расщепления, можно использовать для определения ориентационных и геометрических параметров молекулы.

Тензор q имеет нулевой след и поэтому практически не влияет на спектры ЯМР в изотропных растворах, за исключением уширения линий в некоторых случаях. В анизотропных растворах эффект уширения линий также имеет место, но наряду с ним из-за ненулевого среднего значения q_{izz} в спектрах появляются дополнительные расщепления.

На практике для большинства квадрупольных ядер такого расщепления не наблюдают из-за быстрой релаксации. Ядра иода, брома и хлора, имеющие очень большие значения eQ_i , не могут дать разрешенные спектры ЯМР, если, конечно, симметрия или упорядочение не таково, что V_{izz} достаточно мал. У ядер ^2H и ^{14}N значение eQ_i намного меньше, поэтому в анизотропных растворителях удается наблюдать квадрупольные расщепления (правда, для ^{14}N в большинстве случаев скорость релаксации все же велика для наблюдения спектра высокого разрешения).

Наиболее удобно ядро дейтерия, у которого значение ядерного квадрупольного момента значительно меньше, и уширение линий не так велико. Поэтому в протонном спектре частично дейтерированных соединений можно наблюдать хорошо разрешенное диполь-дипольное взаимодействие между протонами и дейтронами. Следует отметить, что в спектрах ^2H зачастую не удается наблюдать разрешенные дипольные расщепления, в основном из-за того, что дейтрон-дейтронные взаимодействия в 36 раз слабее соответствующих протон-протонных.

В одних и тех же экспериментальных условиях квадрупольные взаимодействия намного сильнее дипольных, поэтому они могли бы быть альтернативой последним в структурных исследованиях очень слабо ориентированных биомолекул. Для таких целей больше всего подходит опять же дейтерий. Однако низкая чувствительность (в 100 раз меньше чувствительности протона), а также низкое естественное содержание в биомолекулах (в 667 раз меньше, чем содержание водорода) ограничивают его практическое использование.

Зависимость квадрупольных взаимодействий от степени ориентированности молекулы проявляется в квадрупольных расщеплениях сигналов. Обычно в экспериментах ЯМР ориентированных молекул такие расщепления используют лишь для подтверждения и измерения упорядочения лиотропной ЖК-фазы.

Константы квадрупольного взаимодействия дейтерия в $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -обогащенных белках, растворенных в D_2O , в которых все протоны амидных групп подвержены обмену с дейтронами растворителя, можно использовать для описания водородных связей $\text{N}-^2\text{H}\cdots\text{O}=\text{C}$, причем даже в неориентированных образцах.²⁹⁸ Для этого используют зависимость времени релаксации T_1 дейтерия от ККВ, которая, в свою очередь, зависит от длины водородной связи и угла между амидной и карбонильной связями.

Использование ККВ для исследования слабо ориентированных биомолекул стало возможным благодаря недавно разработанным методикам частичного дейтерирования. Однако уширение линий из-за квадрупольной релаксации и неразрешимых дипольных расщеплений в спектрах ЯМР делает их менее перспективными по сравнению с КДВ. Тем не менее с использованием описанной в работе²⁹⁹ методики измерения и интерпретации квадрупольных расщеплений ^2H в спектрах частично дейтерированных и ориентированных белков удалось наблюдать квадрупольные расщепления ^2H метильных групп боковых цепей молекулы белка.

В работе³⁰⁰ показана возможность применения ККВ для определения строения и динамики слабо ориентированных дейтерированных углеводов. Разработана специальная импульсная схема двумерного $^1\text{H}-^2\text{H}$ -эксперимента и показана перспективность ее применения для исследования небольших молекул углеводов. При этом, правда, требуется

частичное дейтерирование и ^{13}C -обогащение исследуемых молекул. Применимость такой схемы для больших биомолекул также ограничена временами релаксации ^2H .

VI. Стратегия определения структуры слабо ориентированных биомолекул методами спектроскопии ЯМР

1. Алгоритмы расчета структуры

Для определения структуры биомолекулы используют разнотипную информацию. Алгоритм расчета структуры³⁰¹ предусматривает минимизацию функции полной энергии системы E_t

$$E_t = E_c + E_{vw} + E_{\text{NMR}},$$

где E_c определяет ковалентную геометрию (длины связей, углы, плоскости, хиральность); E_{vw} — учитывает контакты без образования ковалентной связи (например, отталкивание или некие эмпирические функции, включающие потенциал Леннард-Джонса, электростатический потенциал и потенциалы водородных связей); E_{NMR} — описывает экспериментально определяемые параметры ЯМР в виде ограничений, которые устанавливаются в ходе разнотипных экспериментов ЯМР, проводимых в различных средах.

Последний член E_{NMR} состоит (условно) из трех слагаемых

$$E_{\text{NMR}} = E_i + E_a + E_{\text{DB}},$$

где E_i — включает параметры ЯМР, не зависящие от ориентации; E_a — включает параметры ЯМР, зависящие от ориентации; E_{DB} — эмпирическая информация, найденная в базах структурных данных.

В член E_i входят параметры ЯМР, определяемые из изотропных спектров. В частности,

$$E_i = E_O + E_J + E_{J_{\text{CH}}} + E_{J_{\text{CC}}} + E_{\text{C}(\text{shift})} + E_{\text{H}(\text{shift})} + \\ + E_{\text{relax}} + E_{\text{N}(\text{relax})} + E_{\text{CCR}} + \dots$$

Здесь E_O учитывает кросс-пики ЯЭО; E_J — вицинальные константы 3J ; $E_{J_{\text{CH}}}$ — константы $^1J_{\text{CH}}$, $^2J_{\text{CH}}$ и $^3J_{\text{CH}}$; $E_{J_{\text{CC}}}$ — константы $^1J_{\text{CC}}$, $^2J_{\text{CC}}$ и $^3J_{\text{CC}}$; $E_{\text{C}(\text{shift})}$ — химические сдвиги C^α и C^β ; $E_{\text{H}(\text{shift})}$ — химические сдвиги протонов; E_{relax} — времена релаксации ^{13}C и ^2H ; $E_{\text{N}(\text{relax})}$ — отношение времен релаксации T_1/T_2 для атома ^{15}N ; E_{CCR} — данные по кросс-коррелированной релаксации и т.д.

Для каждого члена рассматриваемой функции вводят соответствующий потенциал, который обычно имеет вид

$$E = k(\delta_{\text{calc}} - \delta_{\text{obs}})^2,$$

где k — силовая постоянная, а δ_{calc} и δ_{obs} — рассчитанные и измеренные значения соответствующей энергии.^{141, 302}

Рассмотрим более подробно вклад E_a

$$E_a = E_d + E_{\text{CSA}} + E_{\text{QCC}} + \dots,$$

где E_d — дипольные константы D_{ij} пар $^{15}\text{N}-^1\text{H}$, $^{13}\text{C}-^1\text{H}$, $^1\text{H}-^1\text{H}$, $^{15}\text{N}-^{13}\text{C}$; E_{CSA} — анизотропия химического сдвига атома ^{13}C ; E_{QCC} — квадрупольные константы Q_i .

Из полученных в эксперименте ЯМР разнотипных данных формируют набор так называемых «ограничений» на расстояния и углы в исследуемой молекуле, которые затем используют в итерационной процедуре минимизации полной энергии биомолекулы для нахождения глобального минимума энергии. В этой процедуре, названной подгонкой, применяют различные методы, разработанные в молекулярной динамике. Наиболее популярен метод «медленного отжига».

Результат подгонки оценивают численными критериями качества. В кристаллографии одним из основных критериев качества определяемой структуры служит R -фактор — количественная оценка степени согласования измеренных и вычисленных отражений. Он определяется как

$$R = \sum \frac{|A_e - A_t|}{|A_e|},$$

где A_e и A_t — экспериментальные и вычисленные значения соответственно. Аналогичный критерий можно ввести и для набора КДВ. Однако для КДВ введение R -фактора в таком виде невозможно, поскольку тензор дипольных взаимодействий унитарен, следовательно, среднее значение $|A_e|$ будет равно нулю.

В работе²⁹³ предложено для АХС ввести Q -фактор в виде отношения

$$Q = \frac{\text{rms}(\Delta\delta_1 - \Delta\delta_2)}{\text{rms}(\Delta\delta_1)},$$

где в числителе — среднеквадратичная разность измеренных ($\Delta\delta_1$) и предсказанных ($\Delta\delta_2$) значений.

Этот критерий применим и для КДВ, и для других ориентационно зависимых величин. Однако для них он не совсем удобен при интерпретации, поскольку, хотя его значение в случае полного соответствия равно 0, но в случае полного несовпадения равно $\sqrt{2}$. Поэтому было предложено для КДВ ввести R -фактор в виде³⁰³

$$R_{\text{dip}} = \left[\frac{\langle (D_1 - D_2)^2 \rangle}{2\langle D_1 \rangle^2} \right]^{1/2},$$

где D_1 и D_2 — предсказанные и рассчитанные значения КДВ.

Критерий соответствия в таком виде меньше предыдущего в $\sqrt{2}$. Теоретически такой критерий качества соответствует случаю, когда распределение векторов связей полностью случайное, а их число — бесконечно. В действительности распределение векторов не полностью случайное и число измеренных величин мало и экспериментально определяемое значение $(2\langle D_1 \rangle^2)^{1/2}$ не равно ожидаемой среднеквадратичной разности измеренных и предсказанных величин. Поэтому в той же работе³⁰³ предложен другой критерий качества, который учитывает характер распределения векторов

$$R_{\text{dip}} = \left[\frac{5\langle (D_1 - D_2)^2 \rangle}{2A_a^2(4 + 3\eta^2)} \right]^{1/2},$$

где A_a — аксиальная компонента тензора параметра порядка, а $\eta = A_r/A_a$ — его ромбичность.

Успех применения методов спектроскопии ЯМР для установления структуры биомолекул во многом определяется возможностью их автоматизации. По мере развития многомерных методов и экспериментов по тройному резонансу процедуры отнесения сигналов и определения пространственной структуры последовательно автоматизировали. Этот процесс продолжается и в настоящее время, поэтому есть основание полагать, что в скором времени при определении пространственной структуры биомолекул метод ЯМР будет конкурировать с РСА не только по точности, но и по временным и материальным затратам.³⁰⁴

Рассмотрим типичную процедуру анализа спектров на примере определения структуры белков.

Вначале осуществляют автоматическую обработку многомерного спектра с целью выявления, описания, каталогизации всех наблюдаемых сигналов и их верификации (отделения реальных сигналов от возможных артефактов).

Далее проводят отнесение найденных сигналов к определенным членам первичной последовательности, которое сопровождается выявлением элементов вторичной структуры биомолекулы. При этом используют информацию о гомологичных молекулах с известной структурой, а для распознавания или подтверждения элементов вторичной структуры используют известные химические сдвиги, J -константы, специфичные ЯЭО-сигналы, водородные связи. Некоторую трудность представляет использование КДВ $^1\text{H}-^1\text{H}$ в стандартных программах расчета, поскольку соответствующие расстояния и углы с направлением магнитного поля для большинства пар протонов неизвестны в отличие от констант через одну или через две связи. Поэтому процедура расчета структуры биомолекулы должна предусматривать возможность варьирования и длины и ориентации межядерного вектора. В частности, на примере убиквитина показано, что включение КДВ $^1\text{H}-^1\text{H}$ в расчет значительно повышает точность определяемой структуры.³⁰⁵

Наконец, последний этап — определение трехмерной структуры белка. Первостепенной на этом этапе является задача фолдинга (пространственного сворачивания). Поиск гомологичных структур для фолдинга осуществляют в базах данных (см. ниже).

Разработан алгоритм быстрой упаковки уже известных элементов вторичной структуры молекул белка в глобулу с использованием остаточных КДВ:³⁰⁶ вначале определяют относительные ориентации элементов вторичной структуры друг относительно друга, затем, используя информацию об элементах, находящихся на коротких расстояниях, завершают упаковку элементов вторичной структуры.

Включение возможности анализа КДВ в *ab initio* программу Rosetta позволяет решить проблему фолдинга белка только на основе этих констант, без привлечения дополнительной информации.³⁰⁷

Авторами статьи³⁰⁸ разработана стратегия одновременного отнесения сигналов и фолдинга белковой молекулы, основанная на измерениях КДВ, в соответствии с которой, используя минимальную информацию о химических сдвигах и вицинальных константах, можно достаточно быстро и точно идентифицировать большинство сигналов в спектре ЯМР и получить хорошее начальное приближение для структуры биомолекулы. Это позволяет резко ускорить процедуру определения структуры белков методами спектроскопии ЯМР. Другая похожая стратегия, рассмотренная в работе³⁰⁹, основана на одном трехмерном эксперименте тройного резонанса (НА)CANH.

В общем случае в качестве исходных данных можно использовать разнородную информацию:

- ограничения на расстояния, полученные при анализе многомерных спектров NOESY;
- ограничения на торсионные углы, полученные из экспериментальных и/или статистических данных, включая данные релаксационных экспериментов, NOESY, химические сдвиги и KCCB;
- остаточные дипольные взаимодействия, АХС и ККВ;
- ограничения на расстояния из данных о дисульфидных мостиках и водородных связях.

Существует несколько разных алгоритмов определения структуры с помощью этого набора данных, реализованных в различных программах.^{141, 301} Большинство стандартных программ было разработано до проведения экспериментов с ориентированными биомолекулами. С появлением спектральной информации об ориентированных молекулах такие программы были усовершенствованы. В частности, модифицированы программа XPLOR,^{302, 305} разработаны алгоритмы включения информации о КДВ в программу CNS³¹⁰ и модуль PSEUDYANA программы DYANA, разработанной для учета псевдоконтактных сдвигов.^{154, 158, 297} Новые

версии этих программ уже содержат все параметры, определяемые из спектров ЯМР ориентированных биомолекул.

Одной из важных составляющих процесса определения структуры биомолекул является графическая визуализация молекулярных структур. Для этого чаще всего используют графические выюеры MOLMOL, GRASP, RASMOL, WHATIF и MIDAS. Для расчета и визуализации структур биомолекул из разнотипных данных ЯМР разработан комбинированный пакет программ VMD-XPLOR,³¹¹ а для ускорения процедуры подгонки — специальный модуль IVM, который позволяет использовать внутренние координаты вместо декартовых.³¹²

Интерактивная программа MODULE,³¹³ позволяющая находить из КДВ параметры порядка для макромолекул, а также многодоменных систем и комплексов, является отличным дополнением к имеющимся пакетам программ, используемым при молекулярном моделировании.

Достижения и перспективы развития исследований в области теории и расчета структур биомолекул с использованием данных спектроскопии ЯМР подробно рассмотрены в обзорах^{304, 314}.

2. Дипольное взаимодействие и тензор параметра порядка

Дипольное взаимодействие — одно из уникальных свойств материи, позволяющее получить информацию о структуре и динамике молекул. Отличительной особенностью дипольного взаимодействия между спинами ядер i и j , находящихся в магнитном поле, является его зависимость от расстояния r_{ij} между ними и угла θ между межъядерным вектором \mathbf{r}_{ij} и направлением магнитного поля (рис. 3)

$$D_{ij} = \frac{K(3\cos^2\theta - 1)}{2r_{ij}^3},$$

где $K = (h\gamma_i\gamma_j/4\pi^2)$ — постоянная, зависящая от гиромагнитных отношений γ_i , γ_j ядер i и j соответственно.

Дипольные взаимодействия проявляются как между ядрами одной молекулы, так и между ядрами соседних молекул. В изотропной среде жесткие молекулы расположены хаотично и совершают хаотичные трансляционные и реориентационные движения, поэтому наблюдаемое дипольное взаимодействие усредняется по всему ансамблю молекул и по времени наблюдения, т.е.

$$D_{ij} = K \left\langle \frac{3\cos^2\theta - 1}{2r_{ij}^3} \right\rangle$$

(угловые скобки означают усреднение по времени и по всем возможным ориентациям и расстояниям).

Помимо участия в движениях молекулы как целого, ядра участвуют и во внутримолекулярных движениях; КДВ усредняются и по этим движениям. Так как характеристические частоты этих двух типов движения значительно отличаются, то предполагают отсутствие корреляции между ними, и эти два усреднения рассматривают как независимые операции, т.е.

$$D_{ij} = K \left\langle \frac{3\cos^2\theta - 1}{2} \right\rangle \langle r_{ij}^3 \rangle^{-1}.$$

Если магнитное поле однородно (как это обычно имеет место в спектрометрах ЯМР), то трансляционные движения не влияют на значение усредняющейся константы, она будет зависеть лишь от реориентационных движений и мгновенного распределения направлений осей молекулы в магнитном поле.

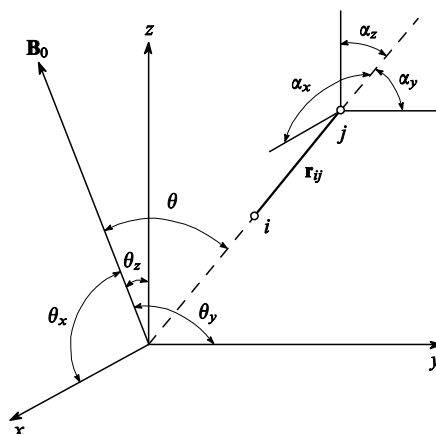


Рис. 3. Схема с обозначением параметров, необходимых для определения дипольного взаимодействия и элементов матрицы порядка Заупе.

i и j — ядра, находящиеся в магнитном поле \mathbf{B}_0 ; θ — угол между межъядерным вектором \mathbf{r}_{ij} и направлением магнитного поля; (x, y, z) — молекулярно-фиксированная система координат; θ_x , θ_y , θ_z — углы между соответствующими молекулярными осями и направлением магнитного поля; α_x , α_y , α_z — углы вектора, соединяющего ядра i и j с молекулярными осями x , y , z .

В изотропной среде в отсутствие ориентирующих факторов пространственное распределение осей молекул сферически симметрично, а времена реориентационного движения молекулы существенно превышают характерные времена эксперимента ЯМР, поэтому в такой среде дипольные взаимодействия полностью усредняются и не проявляются в спектрах, поскольку среднее значение $\langle (3\cos^2\theta - 1)/2 \rangle$ равно нулю.

Под действием ориентирующих факторов или при помещении исследуемых молекул в ориентированную среду молекулярное движение во всем образце становится анизотропным с выделенным направлением вдоль оси ориентации, называемым директором. Молекулы исследуемого вещества вынуждены двигаться анизотропно, даже если и не проявляют склонности ориентироваться вдоль директора. Это анизотропное движение вместе с частичной ориентацией вдоль директора и делает магнитные диполь-дипольные взаимодействия наблюдаемыми, поскольку в этом случае среднее значение $\langle (3\cos^2\theta - 1)/2 \rangle$ уже не равно нулю.

Заупе³¹⁵ предложил описывать степень упорядочения молекулы величиной $\langle (3\cos^2\theta - 1)/2 \rangle$, названной им тензором параметра порядка, который может принимать значения от -0.5 до 1 . Значение 0 соответствует отсутствию ориентации, а значения 1 и -0.5 — соответственно максимальной ориентированности вдоль и перпендикулярно направлению ориентирующего фактора.

Поскольку магнитное поле в спектрометре имеет пространственно-фиксированные оси, то компоненты тензоров взаимодействий удобно выражать в этой лабораторной системе координат, которая может быть переведена в молекулярно-фиксированную систему координат различными способами: при помощи матрицы порядка, формализма констант движения или усредненной матрицы вращений Вигнера. В схеме Заупе упорядочение молекул описывается симметричной матрицей порядка S , имеющей нулевой след, элементы которой определяются выражением

$$S = \frac{1}{2} (3\cos\theta_p \cos\theta_q - \delta_{pq}),$$

где p, q означают одну из декартовых осей ($p, q = x, y, z$) молекулярно-фиксированной системы координат; θ_x, θ_y и θ_z — углы между соответствующими молекулярными осями и направлением магнитного поля (см. рис. 3); δ_{pq} — символ Кронекера ($\delta_{pq} = 1$ для $p = q$ и $\delta_{pq} = 0$ в остальных случаях).

Степень порядка вдоль оси, содержащей два ядра i и j и составляющей углы α_x, α_y и α_z с молекулярными осями x, y и z определяется выражением:

$$S_{ij} = \sum \cos \alpha_{ip} \cos \alpha_{jq} S_{pq}.$$

Матрица порядка 3×3 характеризуется только пятью независимыми элементами (так как она симметрична и имеет нулевой след, т.е. $S_{xx} + S_{yy} + S_{zz} = 0$). При соответствующем выборе молекулярных осей матрица приводится к виду, в котором ее элементы независимы, а их число, в зависимости от симметрии молекулы, а точнее симметрии системы взаимодействующих ядер, колеблется от 1 до 5. Например, ориентированность высокосимметричных молекул, обладающих трехкратной или выше осью симметрии, можно описать только одним независимым элементом матрицы. Ориентированность молекул, обладающих двумя перпендикулярными плоскостями симметрии, можно описать двумя независимыми элементами. При наличии у молекулы лишь одной плоскости симметрии уже требуется знание трех независимых элементов матрицы параметра порядка. В общем случае, когда молекула асимметрична, три из них определяют направление главной оси тензора относительно направления магнитного поля, а два оставшихся — степень ориентированности вдоль этого направления и степень ориентированности в плоскости, перпендикулярной главной оси. В системе главных осей x, y, z тензор параметра порядка диагонален, только две независимые величины определяют указанные степени ориентированности: S_{zz} и параметр асимметрии

$$\eta = \frac{S_{xx} - S_{yy}}{S_{zz}}.$$

Из-за низкой симметрии биомолекул для описания их ориентированности, как правило, необходимо знать все пять элементов тензора параметра порядка.³¹⁶ В таких молекулах расстояния между прямо связанными ядрами практически не меняются и только две независимые величины определяют ориентированность — параметр порядка и угол между вектором связи и направлением магнитного поля, — поэтому эти параметры часто называют ориентационными ограничениями.

Для наглядности ориентированность биомолекул принято описывать не компонентами тензора S_{ij} матрицы порядка, как это принято в спектроскопии ЯМР для малых молекул,¹³¹ а аксиальной A_a и ромбической A_r компонентами диагонализированного молекулярного тензора ориентированности \mathbf{A} , т.е. в системе главных осей тензора анизотропии магнитной восприимчивости молекулы, а также трех эйлеровских углов, определяющих расположение главной оси этого тензора относительно направления магнитного поля. В такой системе выражение для КДВ между ядрами P и Q имеет вид

$$D_{PQ}(\theta, \varphi) = S \frac{\mu_0}{4\pi} \gamma_P \gamma_Q h \frac{A_a (3 \cos^2 \theta - 1) + (3/2) A_r \sin^2 \theta \cos 2\varphi}{4\pi^2 r_{PQ}^3},$$

где θ и φ — углы векторов ядер P и Q в координатной системе тензора \mathbf{A} , h — постоянная Планка, γ_P и γ_Q — гиромагнитные отношения этих ядер, r_{PQ} — расстояние между ними, S —

главный параметр порядка, μ_0 — магнитная восприимчивость вакуума.

Если тензор магнитной восприимчивости молекулы аксиально симметричен, то η (или A_r) равен 0, и только один параметр S_{zz} (или A_a) определяет КДВ, а они, в свою очередь, определяют направления векторов пар ядер относительно главной оси ориентированности. Это позволяет легко интерпретировать дипольные константы, например для молекул ДНК или некоторых комплексов ДНК–белок.¹⁴¹ Для случаев упорядочения молекул с симметрией, близкой к аксиальной, на примере расчетной программы CNS разработан простой алгоритм включения информации о дипольных взаимодействиях.³¹⁷

Однако чаще всего аксиальной симметрии не наблюдается, поэтому для интерпретации данных необходимо определить и вторую компоненту тензора, указывающую на степень его отклонения от аксиальной симметрии, т.е. его ромбичность или асимметрию. Для молекул с небольшим числом магнитных ядер это сделать трудно.

Для биомолекул, содержащих достаточно много одинаковых пар ядер, вектора которых приблизительно равномерно распределены в пространстве, эта задача существенно упрощается.³¹⁸ В этом случае из анализа гистограммы распределения дипольных взаимодействий (соответствующей спектру порошкового образца) можно однозначно определить аксиальную и ромбическую компоненты диагонализированного тензора (рис. 4). При этом никакой предварительной структурной информации о биомолекуле не требуется, и даже необходимость определения главного направления тензора на этом этапе отпадает.

На таком же принципе основан метод определения компонент тензора диффузии по распределению значений T_1/T_2 ядер ^{15}N амидных групп в молекулах белков.³¹⁹ Следует отметить, что тензоры диффузии и ориентации для белков в бицеллах однонаправлены,³²⁰ что также можно использовать при определении ориентации биомолекул.

Для оценки возможности определения компонент тензора из набора измеряемых ориентационно-зависимых параметров предложен метод анализа характера заполнения ориентационного пространства межъядерными векторами.³²¹

Если для биомолекулы определено мало КДВ, или их распределение в пространстве неравномерно, или они содержат несколько доменов с разной ориентацией, упомянутый выше анализ гистограммы неприменим. Поэтому на основе метода максимального правдоподобия разработана более совершенная методика анализа набора всех КДВ и определения аксиальной и ромбической составляющих параметра порядка.³²²

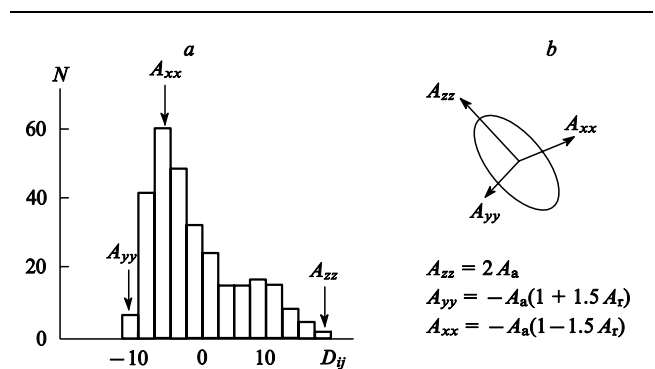


Рис. 4. Гистограмма распределения дипольных взаимодействий (a) и компоненты диагонализированного молекулярного тензора ориентированности \mathbf{A} (b).³¹⁸

Определение ориентации тензора параметра порядка относительно молекулярно-фиксированной системы координат — достаточно сложная задача, однозначное решение которой возможно, если структура биомолекулы уже известна. Это приводит к множественности возможных ориентаций векторов каждой из определяемых пар ядер, соответствующих зеркальным отражениям относительно каждой из осей тензора порядка (всего 8), что сильно усложняет гиперповерхность энергии при поиске минимума. В итоге сходимость итерационного расчета очень медленная.

Проблему оценки значений тензора параметра порядка биомолекул на основе результатов расчетов или специфических экспериментов пытались решить в ряде исследований. Наиболее тривиальный подход — с помощью сеточного поиска среди возможных пар значений параметров A_a и A_r .³⁰²

Если данные о структуре биомолекулы предварительно найдены в других экспериментах, то их можно использовать для более точного определения аксиальной и ромбической составляющих тензора.^{323, 324} Наконец, можно обойтись без предварительного определения значений этого тензора, включив их в программы расчета геометрии биомолекулы как варьируемые параметры.³²⁵ В частности, такая модификация алгоритма программы XPLOR намного облегчила расчет и ускорила его сходимость, причем полученные результаты очень близки к данным, найденным с использованием обычного алгоритма.³²⁶

Для упрощения анализа КДВ предложен метод предсказания ориентационного порядка, основанный на модели, учитывающей стерическое отталкивание между молекулой белка и упорядочивающими частицами ЖК-среды.¹⁹⁷

Разработан и более совершенный метод предсказания параметра порядка с учетом лишь стерических эффектов,³²⁷ в котором исследуемая молекула белка моделируется эллипсоидом. При этом считается, что главные оси тензоров ориентации и момента инерции молекулы совпадают. Для определения других составляющих тензора ориентации применяют обычный алгоритм минимизации разности между предсказываемыми и экспериментально найденными КДВ. Тензор параметра порядка отличается от тензора момента инерции тем, что имеет нулевой след. Поэтому при использовании информации о двух других осях тензора момента инерции для предсказания остальных элементов тензора параметра порядка принимают, что в отсутствие электростатических эффектов собственные векторы этих тензоров параллельны.³²⁸ Получено аналитическое решение задачи упорядочения эллипсоидальных частиц плоской поверхностью. Если известна трехмерная структура молекулы белка, то при помощи простых выражений можно предсказать параметры порядка как молекул белков, включенных в мембраны, так и молекул, упорядочивающихся под действием магнитного поля или ЖК-среды.

В более удобном алгоритме предсказания значений тензора параметра порядка по тензору момента инерции молекулы собственные значения тензора порядка пропорциональны асимметрии молекулы в плоскостях, определяемых соответствующей парой собственных векторов момента инерции.³²⁹ Этот метод, названный авторами TRAMITE (Tracking Alignment from Moment of Inertia Tensors), оказался очень удобным при исследовании не только молекул белков, но и жестких или малых молекул.

Определить относительную ориентацию тензоров параметра порядка белка без знания его структуры можно на основе корреляционного анализа двух наборов КДВ, если провести эксперименты в двух по-разному ориентирующих средах.³³⁰ Графическое представление корреляционной карты таких наборов сильно зависит от относительной ориентации тензоров, поэтому позволяет получить хорошее начальное приближение для дальнейшего анализа КДВ.

Разработана новая стратегия расчета пространственной структуры, основанная на преобразовании набора КДВ в набор межвекторных углов.^{331, 332} Величины, входящие в этот набор, уже не зависят от направления тензора ориентации относительно осей молекулы, и в расчетах их можно использовать вместо КДВ.

Скринников и Кэй³³³ также предложили вместо КДВ использовать набор угловых величин, не зависящий от выбора системы координат. Такой набор оказался очень удобным для оценки соответствия набора КДВ очередной сгенерированной структуре в программах подгонки. Из n векторов дипольных взаимодействий составляют $n(n-1)/2$ новых величин, определяющих углы между каждой парой векторов. Кроме того, для каждого межвекторного угла определяют, исходя из текущей сгенерированной структуры, максимальное и минимальное значения. Если межвекторный угол не находится в интервале между этими значениями, то считается, что зафиксировано несоответствие. Общее число таких несоответствий для данной структуры может служить критерием ее качества, который можно использовать в вычислениях. Для визуализации соответствия КДВ структуре строят «карту соответствия КДВ», с помощью которой очень удобно оценить качество каждого сгенерированного структурного элемента или домена и его соответствие экспериментальным данным.

Рассмотренные методики основаны на стратегии генерализованного, модельно-независимого параметра порядка, разработанной ранее для анализа тензора диффузии при интерпретации релаксационных данных.^{334, 335}

Еще один метод, позволяющий решить проблему неоднозначности и получить точное решение системы уравнений с КДВ, — преобразование таких уравнений в эллиптические уравнения в системе основных осей тензора параметра порядка.³³⁶

Методами молекулярной динамики исследованы эффекты, обусловленные молекулярными движениями разного типа, влияющими на результирующие значения КДВ глобулярного белка.³³⁷ Структуры биомолекул, вычисляемые с помощью этих констант при разных моделях реориентационного движения глобулы, оказались модельно-зависимыми. Показано, однако, что применение разработанной процедуры самосогласования к наборам КДВ, измеренным в нескольких (в идеальном случае в пяти) принципиально разных ориентированных состояниях, позволяет определять структуру, не прибегая к предположениям о характере реориентационного движения глобулы. Данная методика позволяет исключить моделирование таких движений.

На примере рубредоксина показано, что для снятия вырождения ориентационных параметров при определении структуры молекул белков можно использовать две разные бицеллярные среды (для получения большего числа параметров).^{338, 339}

В принципе зависимость дипольных взаимодействий от степени ориентированности молекул белка и ориентации глобулы в магнитном поле спектрометра можно использовать для получения множества наборов параметров при различных направлениях и величинах тензора параметра порядка, например в экспериментах с использованием различных ориентирующих факторов, а также с изменением условий, влияющих на ориентацию (температуры, относительных концентраций компонентов и добавок). Однако определяемые наборы параметров часто оказываются линейно связанными и не дают новой информации.

Точность определения структур биомолекул методом ЯМР пока уступает точности определения методом РСА. Одна из причин этого — несовершенство используемых алгоритмов расчета, в основном скопированных с алгоритмов РСА. По мере развития методов спектроскопии ЯМР

разрабатывают и совершенствуют собственные алгоритмы расчета, отражающие специфику экспериментальных данных ЯМР.³⁴⁰

3. Влияние колебательных движений

При интерпретации набора КДВ обычно полагают, что длины связей постоянны и известны для каждого типа связи. Поэтому измеряемые КДВ описывают либо изменение угловой ориентации среднего положения связи, либо флуктуации вокруг этого среднего положения. Однако из исследований структуры малых молекул с использованием КДВ известно, что влияние колебательного движения молекулы в ряде случаев может быть существенным.³⁴¹

Влияние колебательного движения на усреднение КДВ было исследовано методами квантовой химии на примерах прямых КДВ $N-H^N$, $C^\alpha-H^\alpha$, $C'-N$ и $C^\alpha-C'$, а также КДВ между ядрами $C'-H$, разделенными двумя связями.³⁴² Показано, что колебательное усреднение влияет на значения констант и приводит к результирующему удлинению эффективных длин связей на 0.5–3%, причем влияние деформационных и торсионных колебаний больше, чем валентных. Водородная связь, образуемая амидной группой, также увеличивает эффективную длину связи $N-H$. Изменения эффективной длины связей достаточно малы, но тем не менее их можно использовать, особенно в случаях, когда для определения структуры биомолекулы применяют КДВ от разных типов связей (пар ядер).

4. Базы данных для минимизации энергии и для поиска гомологий и мотивов

Использование для генерации структурных моделей изучаемой биомолекулы гомологичных последовательностей с уже известной структурой — хорошее подспорье в структурных исследованиях.

Самой трудоемкой и продолжительной стадией при исследовании структуры белков методами спектроскопии ЯМР является отнесение сигналов в спектрах к определенным аминокислотным остаткам известной первичной последовательности. Особенно это касается спектров NOESY.

В базах данных белков накоплена информация о пространственном строении большого числа белков и приведены результаты обработки множества спектров ЯМР. Такую информацию можно использовать для распознавания отдельных структурных элементов и мотивов, часто повторяющихся в белках. Особенно это полезно на предварительной стадии.

По-видимому, КДВ — наиболее удобные величины, которые можно измерить и использовать для поиска схожих образов в базах данных белков. Тривиальный способ основан на сравнении всего массива измеренных КДВ $N-H$ исследуемой биомолекулы с массивами таких констант, вычисленных из известных структур, которые включены в базы данных белков.³⁴³ Так, для поиска гомологий в PDB Мейлер с сотр.³⁴⁴ создал программу *DipoCoor*, в которой учитываются все типы КДВ и даже псевдоконтактные сдвиги.

Авторами статьи³⁴⁵ разработан метод построения трехмерной структуры молекулы белка с помощью поиска похожих фрагментов в специально созданной выборке из PDB. Фрагмент должен содержать 7 аминокислотных остатков. Сравнение проводят не только по КДВ, но и по химическим сдвигам, взятым для каждого фрагмента из специальной базы данных.

Вместо сравнения всего массива КДВ $N-H$ можно с помощью методов распознавания образов искать в базах данных структурные мотивы (фрагменты), содержащие, например, ~20 аминокислотных остатков. Авторы рабо-

ты³⁴⁶ предполагают создать на основе имеющихся баз данных белков библиотеку структурных мотивов для использования в исследованиях с помощью КДВ. Применяя специальные критерии соответствия (например, критерий самосогласованности взаимоперекрывающихся фрагментов) для каждого набора экспериментальных данных можно последовательно сужать выборку фрагментов.³⁴⁷

Возможно построение множества подобного типа схем конструирования структуры белка с использованием гомологий и КДВ. Однако информацию, содержащуюся в базах данных белков и нуклеиновых кислот, можно использовать для определения структуры биомолекул и иным способом.

К настоящему времени с высокой точностью установлены кристаллические структуры многих белков и нуклеиновых кислот. Анализ показал, что в этих структурах энергетически возможно лишь небольшое число диэдральных углов, определяющих конформацию молекулы. Такую конформационную информацию, накопленную в виде базы данных, можно использовать для определения структуры новых биомолекул.

Чтобы из числа возможных конформаций, предлагаемых процедурой подгонки структуры к результатам эксперимента, отобрать те, которые физически реализуются и описаны в базах данных, в функцию энергии вводят дополнительный псевдопотенциал в виде

$$E_{DB}(i) = -k_{DB}(\ln P_i),$$

где k_{DB} — масштабный коэффициент или силовая постоянная, а P_i — парциальная вероятность того, что значение данного параметра находится в соответствующей разрешенной области значений.

Введение такого псевдопотенциала в функцию энергии ограничивает возможный выбор диэдральных углов и ускоряет сходимость при итерационных расчетах.

В работах^{348–355} рассмотрены аналогичные потенциалы с одно-, двух-, трех- и четырехмерными потенциальными поверхностями, описывающие степень правдоподобия различных комбинаций торсионных углов.

Использование таких потенциалов для минимизации особенно эффективно при подгонке параметров, определенных из спектров ориентированных образцов, например дипольных взаимодействий. В частности, введение подобного потенциала для описания позиционного взаимодействия между парами оснований в нуклеиновых кислотах резко повысило точность структур ДНК, определенных в экспериментах на основе ЯЭО и с использованием КДВ.³⁵⁶

5. Определение строения биомолекулы с использованием только дипольных взаимодействий

В настоящее время трехмерную структуру биомолекул, как правило, определяют с использованием ЯЭО. Появившиеся в последние годы новые методы спектроскопии ЯМР обычно рассматривают как дополнительные и используют в случаях, когда число сигналов ЯЭО недостаточно. Однако постепенно они превращаются в самостоятельные методы независимого (без использования данных ЯЭО) определения структуры.

Метод определения структуры биомолекул с использованием только КДВ вполне мог бы быть самодостаточным, если бы не проблема неоднозначности интерпретации КДВ, связанная с четырехкратным вырождением и неоднозначностью определения ориентации тензора порядка.

Первую попытку использовать только ориентационные параметры в структурных исследованиях предпринял Тжандра.³⁵⁷ Затем при исследовании цитохрома c' (правда, несколькими методами) авторы работы³⁵⁸ разработали алгоритм, позволяющий без привлечения данных по ЯЭО определять структуры любых парамагнитных белков и

комплексов. В алгоритме используется геометрическая информация, содержащаяся в парамагнитных псевдоконтактных сдвигах¹⁵⁸ и кросс-коррелированной Кюри спин-дипольной электрон-ядерной релаксации,^{153, 359} а также информация, содержащаяся в КДВ (использовали только КДВ N–H). На основе такого алгоритма создана программа SCULPTOR (Structure Calculation Using Long-range, Paramagnetic, Tensorial and Orientational Restraints) для определения структур биомолекул с использованием лишь ориентационно-зависимых данных. Этот алгоритм применим также ко многим металлсодержащим молекулам.¹⁴³

В работе⁴⁶ предложен алгоритм определения структуры молекул белков с использованием только КДВ. Авторы назвали его MECCANO (Molecular Engineering Calculations using Coherent Association of Nonaveraged Orientations). Эта ключевая работа, в которой продемонстрирована реальная возможность определения структуры биомолекулы только из набора КДВ. Для решения проблемы неоднозначности определяли два набора КДВ для молекул в ЖК-средах с различной ориентированностью, а также проводили процедуру самосогласования всех КДВ для каждой пептидной плоскости.

Проблему неоднозначности при интерпретации КДВ, определенных в одном эксперименте, устраняли за счет привлечения дополнительной информации.³⁴⁵ В частности, предложен новый алгоритм фолдинга белка, с помощью которого при поиске и отсеивании структур белковых фрагментов в базе добиваются самосогласования всевозможных фрагментов белка.³⁴⁷

Еще один алгоритм с использованием только КДВ и изменений химических сдвигов атомов углерода карбонильных групп предложен в работе²⁸⁸.

В работе³⁶⁰ доказана самодостаточность КДВ для структурных исследований биологических макромолекул методами спектроскопии ЯМР.

VII. Применение спектроскопии ЯМР для исследования структуры биомолекул

Как уже отмечалось во Введении, методы РСА и ЯМР основаны на принципиально разных физических явлениях и структурные данные, определяемые с их помощью, взаимно дополняют друг друга. С использованием РСА определяют трехмерную карту электронной плотности молекулы, из которой находят взаимное расположение атомов (каждая экспериментальная точка на карте содержит информацию о всех атомах); с использованием ЯМР определяют расстояния и углы между некоторыми парами атомов, по которым воссоздают набор взаимонепротиворечащих трехмерных структур, а каждая экспериментальная точка содержит информацию о расстоянии между какой-то парой атомов, о величине какого-нибудь угла или об ориентации вектора какой-нибудь связи относительно выделенного направления. При исследованиях методом РСА атомы водорода практически не видны, а в ЯМР-исследованиях они являются источником основной информации. В свою очередь, методом ЯМР практически не определяются атомы кислорода и серы. Если для решения фазовой проблемы с помощью РСА необходимо наличие в молекуле тяжелого атома, то в случае ЯМР необходимо изотопное обогащение для замены немагнитного ядра ^{12}C и квадрупольного ядра ^{14}N их магнитными изотопами — соответственно ^{13}C и ^{15}N . Методом РСА определяют статичную (замороженную) структуру биомолекулы, в которой подвижные группы отсутствуют, а с использованием ЯМР можно исследовать биохимические процессы и динамику подвижных групп.

Ниже мы вкратце рассмотрим основные достижения и возможности метода ЯМР слабо ориентированных молекул в исследовании разных классов биомолекул.

1. Белки

Одно из преимуществ методик ЯМР с ориентированными образцами заключается в том, что информацию о дальнем порядке можно получить из параметров дипольных взаимодействий. Благодаря этому удается существенно повысить точность определения структур молекул белков и белковых комплексов, определяемых другими методами спектроскопии ЯМР.

Число измеряемых КДВ, характеризующих полипептидную цепь, велико. Оно может быть значительно увеличено за счет изотопного замещения немагнитных ядер на магнитные. Во многих работах убедительно показана эффективность и простота включения КДВ в стандартный набор параметров для определения пространственной структуры не только биомолекул, но и их комплексов.^{361–367} Например, авторы статьи³⁶⁸, добавив КДВ к данным ЯЭО, смогли определить строение белка киназы *Yur2*.

В работе³⁶⁹ изучена структура очень важного анти-ВИЧ белка циановирина-N, который связывается с гликопротеинами белковой оболочки вирусов и ингибирует их активность. Этот белок может стать ключевым при разработке новой стратегии защиты от ВИЧ-инфекции. Проведено также отнесение сигналов ^1H , ^{13}C , ^{15}N и по анализу КДВ подтвержден закрученный вариант фолдинга,³⁷⁰ что существенно для дальнейшего исследования взаимосвязи структура – активность белка.

Структура сигнального белка G α человека (GAIP) в растворе была определена в двух различных ЖК-средах.³⁷¹ Сравнение с кристаллической структурой гомологичного белка крысы RGS4 в комплексе с α -блоком G белка показало наличие одинаково ориентированных фрагментов, не меняющихся после связывания с G α , что свидетельствует о неучастии этих фрагментов в G α -взаимодействии. Сравнительный анализ структур связанного и свободного белков позволил представить геометрию связывания и механизм активации GTPазы.

Структура белка DinI, который ингибирует активность белка RecA *Escherichia coli*, инициирующего восстановление или мутагенез ДНК, тоже была определена в двух разных ЖК-средах (бицеллы и фаги).³⁶⁶ Благодаря этому удалось установить роль С-концевой α -спирали, образующей отрицательно заряженный гребень на глобуле, электростатически имитирующий фосфодиэфирную цепь ДНК, что позволяет ей конкурировать с ДНК за связывание с RecA.

Обстоятельно исследована³⁷² структура белка куриного лизоцима в двух различных бицеллах с разной ориентацией, причем проведен сравнительный анализ и оценена значимость всех типов параметров ЯМР. Структура белка в этом исследовании определена точнее, чем это было сделано с помощью РСА.

С помощью КДВ удалось изучить термостабильность белка апорубредоксина в нативной (металлсодержащей) и безметалльной формах.³⁷³ Нативная форма белка оказалась достаточно стабильной в широкой области температур; безметалльная форма подвержена обратимой термической денатурации.

Анализ КДВ для молекул денатурированных белков в растянутом полиакриламидном геле показал, что топология нативного состояния отдельных элементов белковой структуры сохраняется^{374, 375} и не чувствительна к заменам в аминокислотной последовательности гидрофобных остатков на полярные близкого размера.³⁷⁶

2. Ориентация доменов в белках

Молекулы многих белков состоят из двух или более независимых упакованных доменов. Характер осуществляемых многодоменными белками биологических процессов, таких, например, как ферментативный катализ, часто зависит от относительной ориентации доменов. Поэтому одной из целей структурных исследований является определение относительной ориентации доменов. Кристаллические структуры таких белков могут отличаться от структур, реализуемых в жидкости, поскольку силы, возникающие при кристаллической упаковке, могут изменить взаимную ориентацию доменов. В исследованиях многодоменных белков методом ЯМР в жидкости можно определить ориентацию доменов и ее изменение под действием различных факторов (например, вследствие связывания с лигандом или ковалентных взаимодействий). Однако обычно число наблюдаемых междоменных контактов мало. Поэтому только измерение ориентационно-зависимых параметров ЯМР предоставляет принципиально новые возможности для определения ориентаций доменов или элементов вторичной структуры молекул нежестких белков.

Иллюстрацией сказанного могут служить результаты исследования двухдоменного белка лектина из ячменя.³⁷⁷ Вначале была продемонстрирована принципиальная возможность использования КДВ ^{15}N – ^1H для определения относительной ориентации доменов фрагмента этого белка и дано теоретическое обоснование метода SVD (Singular Value Decomposition).³⁷⁸ Чтобы найти ориентацию каждого домена, необходимо небольшое число КДВ (достаточно даже пяти). Изучение ориентации и динамики доменов проводили в различных ЖК-средах.³⁷⁹ Оказалось, что ориентация доменов отличается от ориентации, определенной из кристаллической структуры высокомолекулярного белка. Кроме того, из значений параметров порядка доменов следует, что они имеют различную реориентационную динамику и могут рассматриваться как реориентирующиеся независимо.

В работе³⁸⁰ по определению взаимной ориентации Zn-finger доменов белка TFIIIA в комплексе белок–ДНК также показано, что КДВ — высокочувствительные и надежные параметры. С включением КДВ разброс значений ориентации двух доменов комплекса (хорошо исследованного методами РСА, ЯМР и компьютерного моделирования) сократился с 24 до 9°. Правда, и в этом случае необходимо предварительно знать локальную структуру доменов, причем от ее точности зависит и точность определения ориентации с использованием КДВ.

Удалось установить относительную ориентацию мономерных субъединиц димера циановирина-N,³⁸¹ а также полную структуру его мономерного мутанта.³⁸² Было использовано сочетание методов SVD³⁷⁸ и расчетов на основе формы молекулы,¹⁹⁷ при этом было задействовано менее трети общего числа КДВ. Еще более удачным для определения полной структуры этого белка стало объединение методов «медленного отжига», динамики торсионных углов и минимизации как жестких тел.³⁸³ Комбинации подобных методов открывают большие перспективы для быстрого определения полной структуры гомологичных или химерных белков и структурного анализа мутаций, если структура основного белка известна.

Чтобы показать разную ориентацию доменов рибосомального белка S4 D41 в кристаллической и в жидкой фазах авторы статьи³⁸⁴ использовали КДВ, измеренные в двух разных одноосных ЖК-фазах, образованных бицеллами DMPC/DHPC и бактериофагом Pf1. Показано, что ориентации доменов, определенные в изотропной среде при помощи ЯЭО и в двух анизотропных средах, идентичны, а спираль-

ный субдомен повернут на 45° вокруг длинной оси молекулы по сравнению с субдоменом в кристаллической фазе.

Чтобы установить взаимное расположение доменов, используют также явление ориентации парамагнитных белковых металлокомплексов в магнитном поле.¹⁴⁴ Для этого можно, например, в кальцийсодержащих белках заменить диамагнитный ион Ca^{2+} на парамагнитный Tb^{3+} . Такая замена практически не влияет на структуру белка в целом. Показано, что Tb^{3+} связывается только в одном из доменов и вызывает значительную ориентацию белка. При этом появляется возможность измерять не только междоменные дальнедействующие псевдоконтактные сдвиги, но и КДВ.

Если известна кристаллическая структура многодоменного белка, то взаимную ориентацию его доменов в жидкости можно легко определить, измеряя КДВ лишь для некоторых легко идентифицируемых остатков, входящих в различные домены.³⁸⁵ В частности, таким образом определена конформация комплекса мальтодекстрина-связывающего белка МВР с β -циклодекстрином, содержащего 370 остатков, и показано, что взаимные ориентации его доменов в кристаллической структуре и структуре в жидкости значительно различаются (на $\sim 11^\circ$), хотя строение каждого домена соответствует кристаллическому. При определении полной структуры этого белка с использованием КДВ, ЯЭО и вицинальных констант³¹⁰ подтверждена ориентация доменов, найденная экспресс-методом.³⁸⁵ Измерения анизотропии тензора диффузии³⁸⁶ также подтвердили взаимную ориентацию доменов, установленную при помощи КДВ, и показали значительное расхождение с данными РСА. Наконец, при помощи КДВ было проведено систематическое исследование взаимной ориентации доменов свободного и связанного с β -циклодекстрином и мальтоотриозой белка МВР в растворе.³⁸⁷ Оказалось, что ориентации доменов апо-МВР и комплекса МВР с мальтоотриозой совпадают с их ориентациями в кристаллической фазе, тогда как для комплекса МВР– β -циклодекстрин — расходятся. Авторы объяснили это эффектом кристаллической упаковки.

Расхождение конформаций многодоменных белков, определенных в кристаллической фазе и в растворе, скорее всего, не исключение, а правило. Поэтому спектроскопию ЯМР ориентированных биомолекул можно считать уникальным методом исследования их конформаций в растворе. Такие исследования особенно важны при изучении ферментов и при поиске новых лекарственных средств.

Для определения ориентации доменов можно использовать и КДВ $^{13}\text{C}^\alpha$ – $^{13}\text{C}^\beta$ в белках, обогащенных ^{15}N , ^{13}C , ^2H (см.²⁴⁵). Следует отметить, что и внутри- и междоменная структуры одного из исследованных белков, а именно белка, связывающего мальтозу, в жидкости и в кристаллическом состоянии оказались близки.

При помощи КДВ продемонстрирована уникальная возможность быстрой идентификации средних и широкомасштабных междоменных движений в модульных белках.³⁸⁸ Фактически в КДВ заключена информация об относительных движениях доменов и, используя ее наряду со структурной информацией и релаксационными данными, можно вычислить амплитуды и временные шкалы этих движений.

При исследовании взаимной ориентации доменов лизоцима бактериофага Т4 с использованием КДВ определена его усредненная конформация в растворе.³⁸⁹ Лизоцим Т4 гидролизует $\beta(1-4)$ -гликозидную связь пептидликанового субстрата, который связывается с белком в щели между двумя доменами. Кристаллические структуры различных мутантов этого фермента имеют разные значения угла раскрытия щели, что предполагает значительную подвижность доменов. В структуре нативного фермента в растворе угол раскрытия щели оказался на 17° больше, чем в кристаллической фазе.

Значительное расхождение (25°) с кристаллической структурой наблюдалось у белка Ca^{2+} -кальмодулина.³⁹⁰

Возможность исследования с помощью КДВ зависимости функциональных свойств от малых структурных различий в гомологических рядах белков показана на примере изменения геометрии связывания кальмодулина пятью различными кальмодулин-регулирующими киназами.³⁹¹

Еще один пример — определение взаимной ориентации субдоменов гепарин-связывающего домена эндотелиального ростового фактора VEGF_{165} , которое стало возможным лишь при включении в анализ КДВ.³⁹²

С использованием КДВ можно также исследовать динамику подвижных фрагментов в жестких белках, сверяя усредняющиеся по различным моделям движений значения КДВ с их экспериментальными значениями. Таким способом, например, в молекуле белка p8^{MTSP1} установлены взаимное расположение и подвижность трех спиралей.³⁹³

Упомянутая выше графическая интерактивная программа³¹³ MODULE удобна для моделирования многодоменных макромолекул. Она позволяет описывать каждый домен своим набором КДВ. Изменяя ориентации доменов, находят наилучшее согласие наборов КДВ с экспериментальными данными.

Разработанные методы исследования взаимной ориентации и динамики отдельных доменов белка можно использовать и для исследования структуры и динамики отдельных жестких фрагментов различных молекулярных систем, например в жестких белках, олигосахаридах, молекулярных комплексах. Очевидно, они будут полезны и при исследовании жестких органических молекул и жидких кристаллов.³⁹⁴

3. Комплексы белок – лиганд

Определение геометрии связывания белка с лигандом важно для изучения взаимосвязи структуры и биологической функции белков.³⁹⁵ Знание пространственной структуры комплекса белок–лиганд необходимо при разработке новых фармацевтических препаратов, так как поиск нового препарата можно вести целенаправленно, обеспечивая структурную и зарядовую комплементарность искомого лиганда активной полости белка.

Спектр ЯМР лиганда обычно относительно прост, сигналы в нем легко идентифицировать даже без изотопного обогащения. Это учтено в наиболее распространенной схеме исследования белковых комплексов, в соответствии с которой используют $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -обогащенные белки и изотопно не обогащенные лиганды. Благодаря этому можно применять специальные методы гетероядерного фильтрования и редактирования при проведении экспериментов по наблюдению корреляций резонансов только белка, только лиганда или только взаимодействий белка с лигандом через пространство.^{24, 396}

Исследование изменения конформации лиганда при связывании в белковых комплексах часто затруднено, особенно в комплексах, характеризующихся слабым сродством. В этом случае из-за быстрого обмена не удастся наблюдать спектры лиганда в связанном и в свободном состоянии отдельно. Поэтому предложено использовать дипольные взаимодействия лиганда в ориентированном комплексе. В работе³⁹⁷ на примере белкового комплекса трисахарида показана возможность измерения ориентационных параметров лиганда в свободном и связанном состояниях и определения его конформации.

Изотопное обогащение белков, в отличие от изотопного обогащения малых органических молекул, в настоящее время нетрудная задача. При разработке новых лекарств использование традиционных методик ЯМР осложнено тем,

что лиганд становится как бы невидимым. Структура необогащенного лиганда, находящегося в комплексе с обогащенным белком, может быть определена при помощи КДВ для лигандов, определенных в ориентированном комплексе.³⁹⁸ Установить структуру всего комплекса с наибольшей точностью можно, если при определении структуры белка также использовать КДВ.

Разработаны алгоритмы для определения геометрии комплексов, включающие ориентационные параметры лиганда и белка и учитывающие молекулярную симметрию.³⁹⁹ С использованием подобных алгоритмов была найдена геометрия лиганда α -метил-D-маннозида и его комплекса с белком массой 53 кДа.⁴⁰⁰

В работах^{401, 402} исследована ориентация лиганда (представляющего собой фрагмент белка трансдуктина), слабо-связанного с мембранным родопсином активирующимся, под действием света. Родопсинсодержащие диски ориентируются подобно мембранным фрагментам. Показана возможность изучения динамики связывания и ориентации лиганда.

Измерения КДВ ^{13}C -обогащенного Gb3-олигосахарида⁴⁰³ позволили установить место его связывания с белком веротоксином 1. Трисахарид находился в быстром обмене между связанным и свободным состояниями во временной шкале ЯМР, и измеряемые КДВ представляли собой средневзвешенные величины по этим состояниям. По результатам моделирования (РСА) удалось уверенно идентифицировать одно из трех возможных мест связывания. Структурные изменения, индуцированные лигандом, наблюдали при связывании MBP с β -циклодекстрином.³⁸⁷

4. Комплексы белок – белок

Исследования многобелковых комплексов и взаимодействий белок–белок так же, как и многодоменных белков, с использованием спектроскопии ЯМР в последние годы стали чуть ли не рутинными. В таких исследованиях используют межмолекулярный ЯЭО, кросс-поляризацию, парамагнитные методы, анализ возмущений химических сдвигов, анализ релаксационных параметров и т.п. Но очевидно, что для относительного позиционирования белков в комплексе наиболее перспективно сочетание методик, использующих КДВ с методами TROSY.⁴⁰⁴

Большинство рассмотренных выше методов определения взаимной ориентации доменов применимы и к исследованию строения комплексов разных типов (белок–белок, белок–лиганд, белок–нуклеиновая кислота).

Если известны структуры каждого из белков, входящих в комплекс, то, используя КДВ и межмолекулярные сигналы ЯЭО, можно быстро и точно определить структуру всего комплекса. В работе⁴⁰⁵ это показано на примере комплекса белок–белок массой 40 кДа. В описанном алгоритме стыковки белков, входящих в комплекс, структуры считают жесткими. Метод позволяет существенно ускорить определение строения комплексов при помощи ЯМР. Таким же методом были определены структуры двух комплексов белок–белок из фосфотрансферазной системы сахаров *E.coli*.^{406, 407}

Авторам работы⁴⁰⁸ для решения проблемы стыковки белков оказалось достаточно информации, содержащейся в КДВ и значениях химических сдвигов.

Для определения взаимной ориентации доменов или молекул в кальций-содержащих белках и комплексах можно воспользоваться простой методикой, не требующей использования ориентирующих растворителей:¹⁴³ ориентация происходит при замещении иона Ca^{2+} близкими по ионному радиусу ионами редкоземельных элементов.

Наличие парамагнитной метки в одном из мономеров симметричных комплексов, например в гомодимере, позволяет снять вырождения и перекрытия в спектрах, связанные с симметрией, и определить КДВ и псевдоконтактные сдвиги, специфичные для каждого из мономеров.⁴⁰⁹

5. Конформации боковых цепей белков

Внимание исследователей пока сосредоточено в первую очередь на изучении пространственной структуры основной цепи белка. Однако существенные детали определяются конформацией боковых цепей, а некоторые из них являются определяющими при функционировании биомолекулы.

Отнесение сигналов ядер атомов боковых цепей к определенным членам белковой последовательности — наиболее трудная и длительная стадия при определении структуры белков традиционными методами, основанными на ЯЭО.

Константы дипольных взаимодействий оказались очень удобными для исследования конформации и динамики боковых цепей. Значения КДВ в боковых цепях могут быть полезны и при определении структуры основной цепи как дополнительные ограничения на структуру. Можно измерить множество разных КДВ (гомоядерных и гетероядерных, между прямо связанными или удаленными ядрами). В основном используют КДВ $C^\beta-H^\beta$ (см.^{259, 260, 264}), $C^\alpha-C^\beta$ (см.^{244, 245, 259}), а также КДВ $C-C$,^{265, 410} $C-H$,^{266, 410} $H-H$ (см.^{264, 265}) в метильных группах.

Уже первые измерения КДВ в боковых цепях показали их хорошее соответствие значениям, предсказанным на основе трехмерной структуры основной цепи белка.⁴¹¹ Дальнейшие исследования подтвердили высокую информативность таких констант не только при установлении структуры белка, но и при исследовании динамики боковых цепей.

В частности, с использованием прямых КДВ $^1H^\beta-^{13}C^\beta$ в CH - и CH_2 -группах²⁶⁰ (которые достаточно легко интерпретируются, особенно с использованием силового потенциала баз данных торсионных углов) с высокой точностью определены торсионные углы χ_1 и их динамика в ^{13}C -обогащенных частично дейтерированных белках.³⁵⁵

Показана также возможность точного определения ориентации функциональных групп аспарагина и глутамина в боковых цепях белков.²⁷⁶ Определение расположения этих групп особенно важно, поскольку они участвуют в специфических водородных связях.

Информация о положении метиленовых и метильных групп важна при определении расположения гидрофобных боковых цепей белков.

Простой и эффективный метод измерения КДВ в метильных и метиленовых группах разработан на основе трехмерной версии хорошо известного эксперимента [$^1H-^{13}C$] ST HSQC.⁴¹¹ Единственным недостатком данного метода является то, что определяется сумма только двух КДВ $C-H$ в метиленовой группе.

Для исследования метиленовых групп ^{13}C -обогащенных белков более удобен метод, специально разработанный на основе S^3E типа эксперимента HSQC.²⁶⁴ Новая импульсная последовательность SPITZE-HSQC (*spin state selective zero overlap HSQC*) позволила одновременно измерить КДВ $C-H$ и $H-H$. На примере метиленовых групп глицина в убиквитине продемонстрированы уникальные возможности метода для быстрого определения абсолютных величин и знаков всех трех КДВ в метиленовой группе $D(H1, H2)$, $D(C, H1)$ и $D(C, H2)$ в спектрах с минимальным спектральным перекрытием и с лучшим отношением сигнал/шум по сравнению с таким отношением в эксперименте HSQC.

Первое же систематическое исследование метильных групп в белках при помощи КДВ показало схожесть их

геометрии, причем среднее значение угла $C-C-H$ (110.9°) оказалось больше 109.5° (см.⁴¹⁰).

Исследование метильных групп осложнено двумя обстоятельствами. Во-первых, четырехкратное увеличение числа резонансных сигналов при выключении развязки от 1H может привести к взаимному наложению пиков и ухудшению разрешения. Специально разработанный эксперимент типа IPAP-ST HSQC позволяет разделить компоненты мультиплетов и существенно облегчает измерение КДВ в метильных группах.²⁶⁶ Во-вторых, вращение метильной группы вокруг трехкратной оси симметрии приводит к уменьшению КДВ в $(3\cos^2\theta-1)$ раз (θ — угол между осью симметрии группы и связью $C-H$), т.е. почти на 70%. В этом отношении более перспективными являются геминальные константы $H-H$, у которых к тому же в одном и том же эксперименте можно измерить и абсолютную величину, и знак.²⁶⁵ Измерения этих констант особенно актуальны, если используют дейтерозамещение, когда молекула белка за исключением метильных групп perdeuterирована.

Измерение квадрупольных расщеплений в спектрах ориентированных белков с частично дейтерированными и ^{13}C -обогащенными метильными группами ($^{13}CH_2D$) — еще одно перспективное направление исследования этих групп. Авторы работы²⁹⁹ интерпретировали наблюдавшуюся высокую корреляцию между квадрупольными расщеплениями и КДВ $^{13}C^{Me}-^{13}C$ как свидетельство схожести всех метильных групп в белках. Они вычислили среднее значение ККВ в метильных группах в приближении их свободного вращения и при угле между осью вращения и осью тензора градиента электрического поля 109.5° . Найденное значение 167 ± 1 кГц авторы предложили использовать в дальнейшем при интерпретации данных по релаксации 2H в метильных группах белков.

При дейтерозамещении у метильных групп наблюдали изотопный эффект. Значения КССВ прямо связанных ядер $C-H$ и $C-C$ уменьшались с увеличением числа дейтерозамещенных протонов в группе.⁴¹² Очень слабый изотопный эффект сказывался и на геометрии метильных групп — угол $C-C-H$ незначительно (на несколько долей градуса) изменялся.

6. Углеводы

Олигосахариды — важнейшие вещества, участвующие во многих процессах, протекающих в клетке. В биологических системах они присутствуют в свободном виде в растворе, а также входят в состав белков (гликопротеины) и липидов (гликолипиды) на поверхности клеток. Их все чаще и чаще используют при разработке лекарственных средств.

Клеточные функции олигосахаридов прямо связаны с их структурой, конформацией и динамикой. Знание этих структур, как в свободном состоянии в растворе, так и в связанном, является важнейшей предпосылкой для понимания основных факторов, управляющих распознаванием олигосахаридов специфичными клеточными рецепторами.

В настоящее время многомерная спектроскопия ЯМР высокого разрешения в сочетании с молекулярным моделированием — основной метод определения структуры углеводов. Внедрение методик, основанных на измерении КДВ, сообщило новый импульс этим исследованиям.

Применять остаточные КДВ для определения структуры и конформационного анализа олигосахаридов начали в 1998 г. сразу в трех исследовательских группах — под руководством Престегарда,⁴¹³ Видмалма,⁴¹⁴ Хоманса,^{415, 416} а позднее и в группе под руководством Буша.⁴¹⁷ Правда, методы, основанные на измерении КДВ и АХС, уже использовали для определения строения ориентированных гликозидов, гликолипидов и других углеводов,^{418–427} но это

направление исследований получило общепризнанное развитие лишь после успешного применения этих методов в исследованиях биомолекул.

Болон и Престегард⁴¹³ предложили простой эксперимент COSY для измерений КДВ $^1\text{H}-^1\text{H}$ в ориентированных олигосахаридах и на примере трисахарида продемонстрировали эффективность ее применения. Большую информационную емкость этих новых данных для конформационного анализа олигосахаридов использовали Кидл и Хоманс⁴¹⁵ для уточнения конформации другого трисахарида, исследованного ранее при помощи ЯЭО и вицинальных констант $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ и $^1\text{H}-^1\text{H}$. Измерения КДВ $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ проводили для ^{13}C -обогащенного трисахарида, растворенного в бицеллярной ЖК-среде.

Авторы работы⁴¹⁴ использовали дипольные взаимодействия $\text{C}-\text{H}$ для исследования конформации тетрасахарида — лакто-N-неотетозы (LNnT) из женского молока с естественным содержанием ^{13}C . Методом минимизации энергии экспериментальные данные были подогнаны к модели молекулы, сгенерированной методами молекулярной динамики. Хорошее соответствие наблюдали для конформации, при которой исследуемый линейный тетрасахарид описывался как одноосный цилиндр. Для подтверждения предложенной модели LNnT был исследован и в двух других лиотропных ЖК-средах с проведением конформационного усреднения.⁴²⁸ Методами Монте-Карло и молекулярной динамики генерировали различные молекулярные структуры, для них вычисляли ориентационные параметры и КДВ, которые сравнивали с экспериментальными значениями. Было показано, что кроме ожидаемого различия ориентационных характеристик тетрасахарида LNnT в двух разных средах наблюдали и небольшое различие в конформациях.

Мартин-Пастор и Буш⁴¹⁷ провели конформационное исследование шести других природных олигосахаридов, выделенных из женского молока, методами молекулярной динамики, спектроскопии ЯМР на основе ЯЭО и измерения КДВ в молекулах, ориентированных в бицеллах. Включение информации, содержащейся в КДВ, существенно повысило надежность и точность результатов. Конформационное исследование этих олигосахаридов, а также пентасахаридов LNF-2 и LNF-3 (LNF — лакто-N-фукопентоза) было продолжено на основе анализа КДВ $\text{C}-\text{H}$.^{418, 429} (Следует отметить, что исследование конформаций таких сложных олигосахаридов проводили без их изотопного обогащения). Для этого разработана стратегия быстрого сравнения и вычисления разности экспериментальных и рассчитанных значений КДВ для большого числа структур, генерируемых при компьютерном моделировании.⁴²⁹ Использовали два разных последовательных алгоритма для анализа тысяч сгенерированных структур в пространстве диэдральных углов, соответствующих высоким и низким значениям минимизируемой энергии. Такая двухэтапная простая стратегия оказалась очень эффективной для конформационного исследования трисахаридных углеводных антигенов крови групп Льюис X и Льюис A,⁴²⁹ а также двух синтетических трисахаридов групп крови A и B и тетрасахарид-альдитола группы крови A.⁴³⁰

Эти исследования показали принципиальную возможность измерения гетероядерных КДВ $\text{C}-\text{H}$ в олигосахаридах с естественным содержанием изотопа ^{13}C , а недавно разработанные методики двумерных экспериментов HSQC с J-модуляцией позволяют измерять их с большой точностью.⁴³¹

Первостепенная важность КДВ $^1\text{H}-^1\text{H}$ для определения трехмерной структуры олигосахаридов отмечена и в рабо-

те⁴³². Авторы разработали новую процедуру измерения КДВ и определили структуру частично дейтерированного декасахарида, используя также и традиционные методы ЯМР. Структуру декасахарида удалось найти лишь при включении в анализ прямых ($^1D_{\text{CH}}$) и дальних (D_{HH}) дипольных взаимодействий. Предложен⁴³³ метод определения конформационной функции распределения для дисахаридов в ЖК-среде.

Новая методология конформационного анализа подвижных олигосахаридов, основанная на использовании КДВ, предложена в работе⁴³⁴. В этой методологии предусмотрен анализ матриц порядка каждого из сахарных колец. По результирующему значению КДВ, усредненных по внутренним движениям, оценивают амплитуду таких движений. Эти данные удачно сочетаются с данными традиционных релаксационных методов.

Константы дипольных взаимодействий $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ и $^1\text{H}-^1\text{H}$ были успешно использованы также для определения структуры и динамики простых сахаров в растворе.⁴³⁵ Показано, что структуры дисахарида сахарозы и трисахарида раффинозы в растворе значительно отличаются от структур в кристаллической фазе. У дисахарида, например, возможны четыре различные ориентации моносахаридов друг относительно друга (например, как доменов белка³⁹⁹). Однако наблюдали только одну ориентацию, возможно из-за короткого связующего звена. В то же время для галактозного фрагмента раффинозы наблюдали явно выраженное динамическое поведение, что значительно уменьшило степень ориентированности этого фрагмента по сравнению с двумя другими.

Квадрупольные взаимодействия в дейтерированных углеводах были использованы для определения строения и динамики $^{13}\text{C}/^2\text{H}$ -обогащенного метил- β -D-глюкопиранозиды.³⁰⁰ Квадрупольные константы эндоциклических дейтериев оказались очень близкими, поэтому в релаксационных исследованиях гликановых фрагментов в гликопротеинах и гликопептидах можно использовать одно среднее значение этой константы.

Сравнение результатов расчетов структуры пентасахарида, построенного из остатков D-маннозы методами молекулярной динамики со структурами, полученными с использованием релаксационных данных и КДВ, показало,³²⁸ что, хотя результаты, полученные с использованием КДВ, хорошо согласуются и с моделью усреднения по всему возможному ансамблю конформаций, и с одной из структур из этого ансамбля, все же корректнее учитывать все конформационные движения молекулы. Релаксационные данные удается интерпретировать лишь в модели ансамбля. Авторы провели также количественный конформационный анализ N-гликана в воде с использованием КДВ и методов молекулярной динамики.⁴³⁶

При определении структуры подвижного гептасахарида⁴³⁷ успех был достигнут благодаря сочетанию традиционных экспериментов ЯМР с измерениями прямых ($^1D_{\text{CH}}$) и дальних (D_{HH}) дипольных взаимодействий.

Пространственную структуру энтеробактериального циклического антигена, содержащего четыре трисахаридных повторяющихся звена, также удалось определить при совместном использовании КДВ, данных экспериментов на основе ЯЭО и вицинальных констант $^3J_{\text{CH}}$ (см.⁴³⁸).

С помощью только КДВ удалось достаточно легко исследовать деформацию фруктофуранозильного кольца сахарозы.⁴³⁹

Таким образом, методы спектроскопии ЯМР ориентированных молекул открывают принципиально новые, уникальные возможности для исследования строения и конформационного анализа как простых сахаров, так и сложных олигосахаридов и их белковых комплексов в растворе.⁴⁴⁰

7. Нуклеиновые кислоты

По сравнению с белками исследование структуры нуклеиновых кислот обычными методами спектроскопии ЯМР намного труднее, что связано с рядом принципиальных отличий этих классов биомолекул. В первую очередь это относительно малое содержание протонов в нуклеиновых кислотах, и, соответственно, малое число сигналов ЯЭО. Во-вторых, из-за линейного строения молекул ДНК в спектрах отсутствуют сигналы ЯЭО между различными частями цепи и присутствуют лишь сигналы от соседних по последовательности нуклеотидов. Даже у менее линейной и имеющей выраженную третичную структуру молекулы РНК число межнуклеотидных контактов очень мало. В-третьих, дисперсия химических сдвигов ядер незначительна, поэтому удастся разрешить относительно небольшое число резонансных сигналов. Наконец, на каждую структурную единицу необходимо определить пять (а не два, как в белках) углов.

Все это означает, что такие глобальные характеристики структур нуклеиновых кислот, как спиральная закрученность, шаг спирали или торсионные углы цепи, трудно определить, хотя ряд локальных конформационных параметров (например, конформации углеводных звеньев и торсионные углы гликозидных связей) удастся установить достаточно точно. Измерение КДВ и АХС слабо ориентированных нуклеиновых кислот предоставляет принципиально новые возможности для их структурных исследований.^{218, 441–444}

Попытки измерить КДВ для нуклеиновых кислот предпринимали уже в первых же экспериментах со слабо ориентированными биомолекулами в бицеллярных системах⁴⁵ и в ЖК-суспензиях фагов,²¹⁹ но лишь авторам работы⁴⁴⁵ удалось, используя КДВ $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ и $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ в комплексе белок–РНК, значительно улучшить разрешение при определении строения нуклеиновой кислоты.

Структура додекамера $d(\text{CGCGAATTCGCG})_2$ ДНК была исследована в бицеллярной среде.⁴⁴⁶ В дополнение к 162 откликам ЯЭО были определены 198 КДВ $^{13}\text{C}-^1\text{H}$, 10 КДВ $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ и 200 КДВ $^1\text{H}-^1\text{H}$. Показано, что структура додекамера в принципе может быть определена с использованием лишь КДВ.

Этот же додекамер был использован для демонстрации метода прямого определения параметров спиралей нуклеиновых кислот при помощи только КДВ,⁴⁴⁷ основанного на анализе их матрицы порядка. Преимущество этого метода заключается в том, что он не требует знания полной структуры молекулы.

В работе⁴⁴⁸ предложен метод быстрого определения мультимерной стехиометрии комплексов нуклеиновых кислот на основе анализа КДВ, индуцированных магнитным полем. В зависимости от числа мономерных единиц в мультимере будут меняться значения компонент диамагнитной восприимчивости мультимера. Определив диамагнитную восприимчивость мономера и найдя из значений КДВ диамагнитную восприимчивость мультимера, можно определить число мономерных единиц в мультимере. Отметим, что при этом не требуется знания какой-либо структурной информации и даже проведения отнесения резонансных сигналов.

При помощи КДВ находят относительные длины водородных связей²⁴⁸ и их ориентацию в ДНК.⁴⁴⁹ Систематическое изучение двух дуплексов ДНК показало,⁴⁵⁰ что при включении КДВ в набор параметров ЯМР, используемых в структурных исследованиях, существенно повышается точность определения как локальной, так и глобальной структуры дуплексов.

С помощью КДВ можно быстро определить относительное расположение известных элементов вторичной струк-

туры РНК.⁴⁴¹ Например, небольшого числа дополнительно измеренных КДВ $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ оказалось достаточно, чтобы определить глобальную структуру транспортной РНК⁴⁵¹ и мотоголовой рибосомы,⁴⁵² локальные структуры спиральных участков которых были уже известны.

Пространственная упаковка гомодимеров нуклеиновых кислот симметрии C_2 однозначно установлена с использованием двух независимо измеренных наборов КДВ.⁴⁵³ В данном случае два независимо ориентированных состояния исследуемых квадруплексов ДНК были получены с использованием раствора бактериофага в качестве ориентирующей среды и под действием сильного магнитного поля спектрометра ЯМР (800 МГц). Разработанная методика продемонстрирована на примере $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -обогащенной дезоксирибонуклеотидной последовательности $d(\text{GGGTTTCAGG})$, которая в растворе димеризуется в квадруплекс и формирует пару триад G(CA) и тетрад GGGG.

Измерение КДВ — достаточно быстрый и простой метод исследования специфических изменений в РНК, происходящих при ее связывании с лекарственными веществами. Это показано на примере исследования конформационных изменений при связывании аминогликозидного антибиотика с цепью РНК.⁴⁵⁴

Для определения геометрии связывания нуклеиновых кислот с фосфодиэфирной цепью предложено измерять КДВ $^1\text{H}-^{31}\text{P}$ (см.^{455, 456}). Показана эффективность методики измерения вицинальных КДВ $\text{H}3'-\text{P}$ (вариант NOESY эксперимента CT COSY), в исследовании упомянутого выше додекамера $d(\text{CGCGAATTCGCG})_2$. Измерения скалярной и дипольной $\text{H}3'-\text{P}$ констант проводили в изотропном и ЖК-состояниях без развязки и в условиях полной развязки от ^{31}P . Другой вариант использования КДВ $^1\text{H}-^{31}\text{P}$ через пространство разработан на основе методики TOCSY.⁴⁵⁵ В этом случае измеряют КДВ $^{31}\text{P}-^1\text{H}$ с протонами H6 и H8 оснований. Эффективность методики показана на примере определения структуры 30-мера HIV-2 TAR РНК в растворе бактериофага Pf₁.

В работе²⁸⁹ при определении структуры нуклеиновых кислот показано, что наблюдаемые большие значения АХС ^{31}P можно эффективно использовать для определения ориентации фосфодиэфирных групп относительно тензора молекулярного упорядочения. Для нуклеиновых кислот пригодны практически все упомянутые выше способы ориентирования, но удобнее всего считается использование для этой цели раствора бактериофага.²²⁰

При наложении в спектре ЯМР многих сигналов протонов, к тому же связанных взаимодействием с соседями (как, например, протоны рибозы РНК), измерение КДВ $^1\text{H}-^1\text{H}$ бывает затруднено. В таких случаях можно использовать избирательно фторзамещенные соединения. В частности, разработана методика таких измерений на основе E COSY с X-фильтрацией. Найденные КДВ $^1\text{H}-^{19}\text{F}$ были успешно применены для определения структуры 2'-F-замещенного 21-мера РНК.⁴⁵⁷

Применение КДВ упрощает исследование структур комплексов типа белок–ДНК^{380, 458–460} и белок–РНК.⁴⁴⁵ В частности, совместное использование измеренных констант J_{NN} через водородную связь и КДВ, индуцированных благодаря ориентации молекул РНК под действием магнитного поля, позволило определить геометрию связывания белка HTLV-I с 30-мером РНК.⁴⁶¹

Авторами статьи⁴⁶² разработан новый алгоритм быстрого отнесения сигналов ЯМР и одновременного определения третичной структуры РНК, в котором стадия продолжительных экспериментов по отнесению сигналов ЯЭО полностью исключена.

Следует отметить, что определение компонент тензора упорядоченности в случае нуклеиновых кислот намного

сложнее, поскольку для них не применим гистограммный метод (см.³¹⁸), основанный на достаточно равномерном распределении в пространстве направлений межъядерных векторов в белках. Для нуклеиновых кислот удачным заменителем может стать стратегия картирования, разработанная Уорреном и Муром,³²² с помощью которой авторы определили структуру сарцин-рициновой петли РНК.⁴⁶³

Таким образом, использование КДВ существенно расширяет современные возможности метода ЯМР при определении структуры любых типов нуклеиновых кислот и их комплексов.^{463–466}

8. Внутренняя динамика

Изучение динамических процессов в макромолекулах — еще одна перспективная сфера использования спектроскопии ЯМР ориентированных биомолекул, которая, в отличие от обычно применяемых методов спиновой релаксации или химического обмена, позволяет получать информацию о динамике в шкале времен, характерной для биологически значимых движений (от пикосекунд до секунд).^{467, 468}

Выше мы уже упоминали работы, авторы которых использовали КДВ при исследованиях динамики боковых цепей белков,²⁶⁰ ориентации доменов,^{379, 385} конформационной подвижности в углеводах.^{328, 434, 436} Однако, как правило, предполагается, что внутренние движения в биомолекулах либо отсутствуют, либо пренебрежимо малы, либо однотипны и имеют аксиальную симметрию.

В реальности же в биомолекулах всегда имеют место различного рода внутренние движения, пренебрежение которыми непременно сказывается на точности структуры, определяемой с помощью КДВ. Дело в том, что при наличии в биомолекуле жестких фрагментов, КДВ определяют не только усреднением по реориентационному движению биомолекулы как жесткой частицы, но и усреднением по внутренним движениям. Дополнительное усреднение приводит к отклонению значений КДВ подвижных фрагментов от значений, ожидаемых для них при данной ориентированности биомолекулы как целого и снижает точность определяемой структуры. Эти отклонения могут служить мерой подвижности данного фрагмента и критерием выбора модели движения.

Для отделения в КДВ структурной информации от динамической развита специальная методология, основанная на анализе матрицы порядка, позволяющая выделять наиболее подвижные фрагменты биомолекулы. Внутренние движения особенно значительны в молекулах углеводов, и, естественно, что КДВ были использованы вначале для изучения их динамики.^{434, 435} Но возможности метода были продемонстрированы и для белков при анализе внутренней динамики убиквитина⁴⁶⁹ и функциональной динамики активного состояния рибонуклеотидбиназы.⁴⁷⁰ Особенно большие перспективы открываются при исследовании внутренней динамики РНК и динамики связывания РНК с белками.⁴⁷¹

Другая методология извлечения динамической информации из КДВ, рассмотренная в работах^{337, 472}, основана на большом числе (не менее пяти) независимых измерений в различных ориентирующих средах.

VIII. Заключение

Представленный в настоящем обзоре материал свидетельствует о стремительном развитии методов спектроскопии ЯМР биомолекул.[‡]

‡ За цикл работ по спектроскопии ЯМР биомолекул К.Вютриху (Швейцария) присуждена в 2002 г. Нобелевская премия.

Достоинством рассмотренного метода ЯМР слабо ориентированных биомолекул является то, что помимо исследования структуры он позволяет достаточно быстро определять относительное расположение отдельных групп при функционировании биомолекулы без необходимости многократного трудоемкого определения структур всех текущих состояний динамической системы.[§] Поэтому данный метод можно рассматривать как наиболее перспективный при изучении взаимосвязи структуры биомолекул и их биологических функций.

Особенно актуально развитие метода ЯМР слабо ориентированных биомолекул для биологии и медицины. Кроме возможностей определения третичной и четвертичной структур, а также динамики биомолекул и их комплексов он позволяет: осуществлять экспресс-диагностику молекул в растворе и исследовать их функции; проводить скрининг лекарственных веществ; быстро устанавливать зависимости структура–свойство мутантных или модифицированных биомолекул; проводить спектроскопические исследования ориентированных или находящихся в обмене между ориентированным и неориентированным состояниями биомолекул различных тканей и органов *in vivo*; визуализировать строение различных биологических объектов с использованием в качестве контрастного фактора степени ориентированности биомолекул или их фрагментов.^{474–477}

Комбинирование рассматриваемого метода с другими методами (например, малоуглового рентгеновского рассеяния в растворе,⁴⁷⁸ дифракционными и современными структурными методами с использованием синхротронного излучения⁴⁷⁹) открывает новые возможности для изучения биомолекул.

В Приложении приведены таблицы с характеристиками систем, используемых для слабого ориентирования биомолекул, а также с результатами исследования структур с использованием метода ЯМР слабо ориентированных молекул, которые можно найти в базах данных PDB и BMRB (Biological Magnetic Resonance Bank).⁴⁸⁰

Авторы выражают благодарность кандидатам химических наук С.С.Мамяну и Г.А.Паносюну за стимулирование и поддержку работы, обсуждение и ценные замечания. Обзор написан при финансовой поддержке Американского фонда гражданских исследований и разработок (CRDF, грант CGP 2002 AC1-2304-YE-02).

IX. Приложение

В табл. П.1 кратко охарактеризованы системы используемые для слабого ориентирования биомолекул. В табл. П.2 приведены зарегистрированные в базах PDB и BMRB структуры биомолекул, при определении которых использовали параметры дипольных взаимодействий. Отметим, что под структурой в данном случае понимают как набор (ансамбль) структур с близкими значениями минимизационных критериев в использованных программах подгонки, так и одну из них, наиболее вероятную. В базах данных зарегистрировано много одинаковых биомолекул под разными номерами. Структуры таких биомолекул были определены или различными группами исследователей, или одной группой, но на основе разных допущений.

§ За цикл основополагающих исследований по разработке техники измерения остаточных дипольных взаимодействий слабо ориентированных молекул трем выдающимся ученым — А.Баксу, А.Ботнер-Баю и Д.Престегарду — была присуждена главная премия на 43-ей конференции по экспериментальному ЯМР (The 43rd Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference. Racivic Grove, CA, 2002).

Таблица П.1.1. Системы, используемые для слабого ориентирования биомолекул (направление ориентации указано по отношению к направлению магнитного поля).

Система	Состав			Биомолекула	Ориентирующий фактор	Направление ориентации	Ссылки
	описание	достоинства	недостатки				
Без ориентирующей среды	Изотропный раствор биомолекул	Не требуется специальных ориентирующих сред	Очень слабая ориентация	Нуклеиновые кислоты, парамагнитные белки,	Магнитное поле спектрометра		42, 43, 140, 142–147, 149, 150, 152, 161
DMPC/DHPC, DMPC/CHAPSO	Диски с капсулированным белком	То же	—	Мембранные белки	То же	⊥	183, 184
DMPC/DHPC	Плоские диски толщиной 4–5 нм	Легко модифицируется	Гидролизует при низких pH	Белки, нуклеиновые кислоты, углеводы	Бипеллы с отрицательной $\Delta\chi$	⊥	174, 175, 179, 180, 182, 185–190, 196
DMPC/DHPC/CTAB	То же	Стабильна, положительно заряжена	—	Белки	То же	⊥	192, 196, 200
DMPC/DHPC/SDS	»	Стабильна, отрицательно заряжена	—	Белки, нуклеиновые кислоты	»	⊥	192, 196
Диазильные фосфолипиды	»	Широкий диапазон pH, устойчива к гидролизу	—	Белки, нуклеиновые кислоты, углеводы	»	⊥	196
DMPC/CHAPSO	»	—	—	Белки, гликолипиды	»	⊥	175, 179, 203
DLPC/CHAPSO	»	Устойчива в широком диапазоне температур	—	Белки	»	⊥	193, 203
DIODPC/CHAPSO	»	Устойчива к гидролизу, стабильна при низких pH	—	»	»	⊥	194, 203
Кислые бипеллы DMPC/DHPC, DMPS/DHPC, DMPC/DHPC/DMPCX	»	Отрицательно заряжена, аналог природных мембран	—	Мембранные белки	—	⊥	182, 195
Бипеллы, допированные ионами P3Э	»	—	—	Белки	Бипеллы с положительной $\Delta\chi$		204–207
DMPC/DHPC + Ln ³⁺	»	—	—	»	То же		206
DMPC/DHPC/DMPCG + DMPE-DTPA (допирован Yb ³⁺)	»	—	—	Углеводы	»		211, 212
DMPC/DHPC	В одной из цепей липида содержится бифенильная группа	—	—	»	»		212
DMPC/CHAPSO + ароматические амфифилы	То же	—	—	Белки	»		191
Бактериофаг Pf1	Отрицательно заряженные цилиндрические частицы диаметром 6.5 нм, длиной 2 мкм	Широкий диапазон концентраций и температур, исследуемое вещество легко извлекается центрифугированием	Агрегируется при низких pH, связывается с некоторыми белками	Белки, нуклеиновые кислоты, углеводы	Нитевидные фаги, вирусы		218, 220–222, 441

Таблица П.1.1 (окончание).

Система		Биомолекула		Ориентирующий фактор	Направление ориентации	Ссылки
состав	описание	достоинства	недостатки			
Бактериофаг fd	Отрицательно заряженные цилиндрические частицы диаметром 6,5 нм, длиной 2 мкм	Широкий диапазон концентраций и температур, исследуемое вещество легко извлекается центрифугированием	Агрегируется при низких pH, связывается с некоторыми белками	Нитевидные фаги, вирусы		202, 224
Вирус табачной мозаики	То же	То же	То же	То же		202, 234
СТАВ/пентанол, дискообразные мицеллы	Образует нематическую ЖК-фазу	Стабильна	Сильный ориентирующий эффект	Ламелли		160
СТАВ, стержнеобразные мицеллы	То же	»	Нестабильна	»		160
Цетилипидиний-хлорид/гексанол	Положительно заряжена, образует ламелярную ЖК-фазу	»	Чувствительна к солям	»		170
Цетилипидиний-бромид/гексанол	То же	»	—	»		171, 200
C8E5/n – октанол, C12E6/n – гексанол	Незаряжена, образует ламелярную ЖК-фазу	Инертна, стабильна, образец можно регенерировать диализом	—	Коаксиальные цилиндрические ламелли		172, 200
Сополимер акриламида и метиленабисакриламида	Незаряжена, ориентируется под механическим воздействием (сжатие, растяжение)	Инертна, ориентацию можно менять, возможно двусторонняя ориентация, исследуемое вещество легко элюируется	Неоднородна, низкие скорости вращательной диффузии	Деформированные поры геля	Зависит от характера механического воздействия	228–231
Природные целлюлозные волокна	Отрицательно заряженные стержни 200 × 10 нм	Стабильна, инертна	Медленно ориентируется	Кристаллиты целлюлозы	⊥	226
Фрагменты мембран галобактерий, содержащие бактериородопсин	Нежидкий кристалл, отрицательно заряжена, ориентирует за счет электростатических взаимодействий	Низкие концентрации, стабилизируется акриламидным гелем	Взаимодействует с белками, агрегируется при высокой ионной силе	Мембранные фрагменты		214, 215, 229
То же, допированное ионами R3Э	То же	—	То же	То же	⊥	216
Пентаоксид ванадия	Отрицательно заряженные ленты длиной до 600 нм	Стабильна, инертна, исследуемое вещество легко извлекается	Низкий pH	ЖК-среда лент		232

Примечание. Приняты следующие обозначения: C8E5, C12E6 — алкилполиэтиленгликоли CmEn, где m — число атомов углерода в алкильной группе, n — число этилен-гликолевых единиц; DBPC — 1-додеканоил-2-(бифенил-4-ацетил)-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; DBBPC — 1-додеканоил-2-(4-(4-бифенил)-бутанол)-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; DMPE/DTPA — диэтилглицеринпентаглат 1,2-димиритостил-*sn*-глицеро-3-фосфотетаноламмония.

Таблица П.2. Примеры биомолекул, структуры которых были определены с использованием КДВ.

Код в базе PDB	Номер в базе BMRB	Описание	Число расчетных структур	Число остатков	Число КДВ	Ссылки
1B4C		Металл-связывающий белок Aro-S100B крысы	21	184	521	362
1C05	4577	Рибосомальный белок S4 δ 1	См. ^a	159	101	384
1C06	4577	То же	16	159	101	384
1C7U		ДНК-связывающий домен фактора транскрипции Mef2A	—	210	368	458
1CMZ	4407	G α взаимодействующий белок	20	152	291	371
1D2B	4327	N-Концевой домен ингибитора металлопротеин-азы-1 тканей человека	29	126	159	365
1D3Z		Убиквитин	10	76	945	293
1D8V	4522	Противоопухолевый белок MAP30	См. ^a	263	387	364
1DUF		Додекамер ДНК d(CGCGAATTCGCG) ₂	5	24	408	446
1GIP		То же	2	24	408	356
1E8L	4831	Гидролаза куриного лизоцима	50	129	209	372
1EKY		Цитохром c' из <i>Rhodobacter capsulatus</i>	32	129		358
1EZR		Мальтодекстрин-связывающий белок в комплексе с β -циклодекстрином	10	370	970	310
1F0A, 1GHH		Белок I (DinI), индуцируемый повреждением ДНК	20	81	534	366
1F16	4632	Про-апоптозный белок Бах	20	192	575	481
1F3Y		Диаденозинтетрафосфатгидролаза из <i>Lupinus angustifolius</i> L.	25	165	94	482
1F70		N-Концевой домен кальмодулина	10	76	—	483
1F71		C-Концевой домен кальмодулина	10	67	—	483
1FH1		Липид-связывающий белок нодуляции Nodf	См. ^b	92	—	306
1FZX		Додекамер ДНК d(GGCAAAAACGG) ₂	10	24	85	484
1G03	4649	N-Концевой домен Htlv-I Ca1-134 вируса Т-клеточной лейкемии человека типа I	20	134	—	485
1G14		Додекамер ДНК d(GGCAAGAAACGG) ₂	10	24	80	484
1GGR		Комплекс фермента Iiaglc и гистидин-содержащего фосфор-переносящего белка Hrg из <i>E.coli</i>	См. ^a	253	—	407
1GJJ		N-Концевая постоянная часть белка ядерной оболочки LAP2	—	—	—	486
1HJ7		Ca ²⁺ -Связывающие домены Ldl рецептора, подобные эпидермальному фактору роста EGF-AB	20	80	—	487
1H92		Домен SH3 тирозинкиназы Lck человека	30	63	44	489
1H9C	4955	Цистенил-фосфорилированный фермент ПВ N,N'-Диацетилхитобиозоспецифичной фосфоенол-пуриват-зависимой фосфотрансферазной системы <i>E.coli</i>	9	106	73	488
1I35		Ras-связывающий домен протеинкиназы Bcr2	10	95	28	368, 490
1IB8		Консервативный белок Sp14.3, кодируемый геном <i>Essential Streptococcus Pneumoniae</i>	См. ^a	164	153	491
1IUF		Два ДНК-связывающих домена в белке Pombe Abp1 из <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	»	144	47	459
1J46		Дикий тип HMG-домена фактора Sry, определяющего мужской пол человека, в комплексе с ДНК	»	113	274/197, 101/96	492
1J47		M9I мутант HMG-домена фактора Sry, определяющего мужской пол человека, в комплексе с ДНК	»	113	274/197, 101/96	492
1J4V		Циановирин-N	»	202	136	383
1J4W		Комплекс доменов КН3 и КН4 FBP человека с одноцепочечным 29-мером ДНК	»	203	140/154	460
1J5K		Комплекс домена КН3 hnRNP K с одноцепочечным дезоксирибонуклеотидом	»	99	147/140	493
1J6T		Комплекс фермента Iiamtl и гистидин-содержащего фосфор-переносящего белка Hrg из <i>E.coli</i>	»	233	528	494
1J7O		N-Концевой домен Ca-кальмодулина	3	71	323	390
1J7P		C-Концевой домен Ca-кальмодулина	3	67	305	390
1JO7		РНК промотор вируса грипп А	32	31	22	281
1JOX		LP5.1 шпилька РНК бактериальной РНКазы Р	24	21		495
1JWE	4297	N-Концевой домен DNAB геликазы из <i>E.coli</i>		114	84	496
1K31, 1KQV		Ca Ln кальбиндин D9K	30	79	64	497
1KSM		То же	См. ^a	79	64	497

Таблица П.2 (окончание).

Код в базе PDB	Номер в базе BMRB	Описание	Число расчетных структур	Число остатков	Число КДВ	Ссылки
1KAT	5185	Пептидный антагонист фага в комплексе с сосудистым эндотелиальным фактором роста	24	118	146	498
1KHM	4405	С-Концевой Kh домен РНК-связывающего белка Hnnp K (Kh3)	20	89	209	361
1KMX		Гепарин-связывающий домен из сосудистого эндотелиального фактора роста	20	55	38	392
1KQQ		Точная копия комплекса Arid-DNA	20	169	94	499
1KVN		РНК-связывающий белок SRP19 из <i>Archaeoglobus fulgidus</i>	10	104	66	500
1KVV		РНК-связывающий белок SRP19 из <i>Archaeoglobus fulgidus</i>	См. ^a	104	66	500
1L4S	5315	Фактор Y, ассоциированный с рибосомой	—	—	—	501
1L5E		«Доменно-обменный» димер циановирин-N в метастабильно упакованном состоянии	»	202	—	502
1LVZ		С-Терминальный белок α -субъединицы трансдуксина, связанный метародопсином II	20	11	38	402
1M2Y		Рубредоксин мутантного штамма <i>P. furiosus</i>	54		308	308
1MAG		Грамицидин А	См. ^a	34	141	95
1QCE	4493	Эктодомен белка оболочки вируса Siv Gp41	29	369		503
1UD7		Мутант убиквитина 1D7	20	76	63	504
2EZM		ВИЧ-инактивирующий белок циановирин-N	См. ^a	101	380	369
2EZN		То же	40	101	380	369
1QCK		ДНК-связывающий белок человека Baf	20	178	259	503
2EZX		То же	См. ^a	178	496	505
2EZY, 2EZZ		»	20	178	496	505
2GAT		С-Концевой домен куриного фактора транскрипции Gata-1, в комплексе с ДНК	См. ^a	98	48	141
3GAT		То же	34	98	48	141
3EZA		Комплекс N-концевого домена фермента I и гистидин-содержащего фосфор-переносящего белка Hrg из <i>E. coli</i>	См. ^a	334	238	406
3EZB		То же	40	334	238	406
3GB1		Иммуноглобулин-связывающий домен B1 белка G из стрептококка	—	56	300	503
4GAT		Дикий домен ДНК-связывающего белка AREA в комплексе с 13-мером ДНК, содержащим CGata участок	См. ^a	92	48	141
6GAT		Мутантный домен ДНК-связывающего белка AREA в комплексе с 13-мером ДНК содержащим TGata участок	»	92	49	141
	4319	Окисленный рубредоксин	—	—	53	506
	4320	Восстановленный рубредоксин	—	—	53	506
	4335	Калеритрин, Са-связывающий белок с «EF-рукой»	—	176	—	363
	4822	Регуляторный домен тропонина С из сердца человека, апо-форма	—	89	53	507
	4823	Регуляторный домен тропонина С из сердца человека, голо-форма	—	89	53	507
	4824	Регуляторный домен тропонина С из сердца человека, комплекс с пептидом	—	89	52	507
	4927	Циркулярно-смещенный вариант ВИЧ-инактивирующего белка циановирин-N	—	202	75	370
	4986	Мальтодекстрин-связывающий белок (MBP)	—	370	903	387
	4987	Мальтодекстрин-связывающий белок (MBP) в комплексе с мальтотриозой	—	370	908	387
	5368	Фактор 1 (ARF1) рибозилирования АДФ человека	—	360	—	508

^a Усредненная структура. ^b Остов. ^c Плюс усредненная структура.

Литература

- H.M.Berman, J.Westbrook, Z.Feng, G.Gilliland, T.N.Bhat, H.Weissig, I.N.Shindyalov, P.E.Bourne. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 235 (2000)
- G.T.Montelione, D.Zheng, Y.J.Huang, K.C.Gunsalus, T.Szyperski. *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 982 (2000)
- J.H.Prestegard, H.Valafar, J.Glushka, F.Tian. *Biochemistry*, **40**, 8677 (2001)
- U.Heinemann, G.Illing, H.Oschkinat. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12**, 348 (2001)
- P.R.E.Mittl, M.G.Grutter. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5**, 402 (2001)
- Р.Эрнст, Дж.Боденхаузен, А.Вокаун. *ЯМР в одном и двух измерениях*. Мир, Москва, 1990
- K.Wuthrich. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. Wiley, New York, 1986
- Computational Aspects of the Study of Biological Macromolecules by NMR Spectroscopy*. (Eds J.C.Hoch, F.M.Poulsen, C.Redfield). Plenum, New York; London, 1991
- NMR of Macromolecules. A Practical Approach*. (Ed. G.C.K.Roberts). IRL Press, Oxford, 1993
- J.N.S.Evans. *Biomolecular NMR Spectroscopy*. Oxford University Press, Oxford, 1995
- Biological NMR Spectroscopy*. (Eds J.L.Markley, S.J.Opella). Oxford University Press, London, 1997
- Carbon-13 NMR Spectroscopy of Biological Systems*. (Ed. N.Beckman). Academic Press, San Diego, 1995
- J.Cavanagh, W.J.Fairbrother, A.G.Palmer, N.J.Skelton. *Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice*. Academic Press, San Diego, 1996
- Protein NMR Techniques. Methods in Molecular Biology. Vol. 60*. (Ed. D.G.Reid). Humana Press, Totowa, NJ, 1997
- K.H.Gardner, L.E.Kay. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **27**, 357 (1998)
- P.Guntert. *Q. Rev. Biophys.*, **31**, 145 (1998)
- G.Wider. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **32**, 193 (1998)
- Modern Techniques in Protein. Series «Biological Magnetic Resonance»*. Vol. 16. (Eds N.R.Krishna, L.J.Berliner). Kluwer Academic-Plenum, New York, 1999
- NMR Structural Computation and Dynamics in Protein NMR. Series «Biological Magnetic Resonance»*. Vol. 17. (Eds N.R.Krishna, L.J.Berliner). Kluwer Academic-Plenum, New York, 1999
- NMR of Biological Macromolecules. Part A. Series «Methods in Enzymology»*. Vol. 338. (Eds T.L.James, V.Dotsch, U.Schmitz). Academic Press, San Diego, 2001
- NMR of Biological Macromolecules. Part B. Series «Methods in Enzymology»*. Vol. 339. (Eds T.L.James, V.Dotsch, U.Schmitz). Academic Press, San Diego, 2001
- L.E.Kay, K.H.Gardner. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **7**, 722 (1997)
- V.Dotsch, G.Wagner. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **8**, 619 (1998)
- G.M.Clore, A.M.Gronenborn. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2**, 564 (1998)
- M.Sattler, J.Schleucher, C.Griesinger. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **34**, 93 (1999)
- K.Pervushin, R.Riek, G.Wider, K.Wuthrich. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12366 (1997)
- K.Pervushin, A.Ono, C.Fernandez, T.Szyperski, M.Kainosho, K.Wuthrich. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 14147 (1998)
- M.Salzmann, K.Pervushin, G.Wider, H.Senn, K.Wuthrich. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 13585 (1998)
- R.Riek, G.Wider, K.Pervushin, K.Wuthrich. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 4918 (1999)
- M.Salzmann, G.Wider, K.Pervushin, H.Senn, K.Wuthrich. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 844 (1999)
- K.Pervushin. *Q. Rev. Biophys.*, **33**, 161 (2000)
- R.Riek, K.Pervushin, K.Wuthrich. *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 462 (2000)
- C.Fernandez, K.Adeishvili, K.Wuthrich. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 2358 (2001)
- G.Siegel, J.van Duynhoven, M.Baldus. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**, 530 (1999)
- G.Wider, K.Wuthrich. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **9**, 594 (1999)
- H.Yu. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 332 (1999)
- M.Salzmann, K.Pervushin, G.Wider, H.Senn, K.Wuthrich. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 7543 (2000)
- R.Xu, B.Auers, D.Cowburn, T.W.Muir. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 388 (1999)
- N.K.Goto, L.E.Kay. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **10**, 585 (2000)
- A.J.Wand, M.R.Ehrhardt, P.F.Flynn. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 15299 (1998)
- R.A.Venters, R.Thompson, J.Cavanagh. *J. Mol. Struct.*, **602–603**, 275 (2002)
- H.C.Kung, K.Y.Wang, I.Goljer, P.H.Botton. *J. Magn. Reson., Ser. B*, **109**, 323 (1995)
- J.R.Tolman, J.M.Flanagan, M.A.Kennedy, J.H.Prestegard. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 9279 (1995)
- J.H.Prestegard. *Nat. Struct. Biol., NMR Suppl.*, **5**, 517 (1998)
- N.Tjandra, A.Bax. *Science*, **278** (5340), 1111 (1997)
- J.C.Hus, D.Marion, M.Blackledge. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 1541 (2001)
- J.R.Tolman. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **11**, 532 (2001)
- H.M.Al-Hashimi, D.J.Patel. *J. Biomol. NMR*, **22**, 1 (2002)
- A.Arora, L.K.Tamm. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **11**, 540 (2001)
- D.Neuhaus, M.P.Williamson. *The Nuclear Overhauser Effect in Stereochemical and Conformational Analysis*. Wiley, New York, 2000
- G.Cornilescu, A.Bax, D.A.Case. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 2168 (2000)
- S.S.Wijmenga, B.N.M.van Buuren. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **32**, 287 (1998)
- D.A.Case. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **8**, 624 (1998)
- D.A.Case. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **10**, 197 (2000)
- D.S.Wishart, A.M.Nip. *Biochem. Cell Biol.*, **76**, 153 (1998)
- G.Cornilescu, F.Delaglio, A.Bax. *J. Biomol. NMR*, **13**, 289 (1999)
- A.J.Dingley, S.Grzesiek. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 8293 (1998)
- A.J.Dingley, J.E.Masse, R.D.Peterson, B.Barfield, J.Feigon. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 6019 (1999)
- S.Grzesiek, F.Cordier, A.J.Dingley. *Methods Enzymol.*, **338**, 111 (2001)
- A.J.Dingley, F.Cordier, S.Grzesiek. *Concepts Magn. Reson.*, **13**, 103 (2001)
- F.Cordier, S.Grzesiek. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 1601 (1999)
- G.Cornilescu, J.-S.Hu, A.Bax. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 2949 (1999)
- G.Cornilescu, B.E.Ramirez, M.K.Frank, G.M.Clore, A.M.Gronenborn, A.Bax. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 6275 (1999)
- N.Tjandra, D.S.Garett, A.M.Gronenborn, A.Bax, G.M.Clore. *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 443 (1997)
- E.de Alba, N.Tjandra. *J. Magn. Reson.*, **144**, 367 (2000)
- B.Brutscher. *Concepts Magn. Reson.*, **12**, 207 (2000)
- B.Reif, M.Hennig, C.Griesinger. *Science*, **276**, 1230 (1997)
- D.Yang, R.Konrat, L.E.Kay. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 11938 (1997)
- D.Yang, K.H.Gardner, L.E.Kay. *J. Biomol. NMR*, **11**, 213 (1998)
- D.Fushman, D.Cowburn. *J. Biomol. NMR*, **13**, 139 (1998)
- C.Richter, B.Reif, C.Griesinger. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 12728 (2000)
- N.R.Skrynnikov, R.Konrat, D.R.Muhandiram, L.E.Kay. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 7059 (2000)
- I.Bertini, J.Kowalewski, C.Luchinat, G.Parigi. *J. Magn. Reson.*, **152**, 103 (2001)
- N.Tjandra, A.Szabo, A.Bax. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 6986 (1996)
- R.Ghose, J.H.Prestegard. *J. Magn. Reson.*, **134**, 308 (1998)
- R.Ghose, K.Huang, J.H.Prestegard. *J. Magn. Reson.*, **135**, 487 (1998)
- D.Yang, Y.-K.Mok, D.R.Muhandiram, J.D.Forman-Kay. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 3555 (1999)
- B.Reif, A.Diener, M.Hennig, M.Maurer, C.Griesinger. *J. Magn. Reson.*, **143**, 45 (2000)
- C.Richter, C.Griesinger, I.Felli, P.T.Cole, G.Varani, H.Schwalbe. *J. Biomol. NMR*, **15**, 241 (1999)
- S.J.F.Vincent, C.Zwahlen. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 8307 (2000)
- K.Kloiber, W.Schuler, R.Konrat. *J. Biomol. NMR*, **19**, 347 (2001)

82. M.Rance. In *Encyclopedia of NMR. Vol. 9.* (Eds D.M.Grant, R.K.Harris). Wiley, Chichester, 2002. P. 354
83. C.Griesinger, J.Meiler, W.Peti. In *Biological Magnetic Resonance.* (Eds N.R.Krishna, L.J.Berliner). Kluwer Academic–Plenum, New York, 2002
84. S.J.Opella, Y.Kim, P.McDonnell. *Methods Enzymol.*, **239**, 536 (1994)
85. F.M.Marassi, S.J.Opella. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **8**, 640 (1998)
86. R.Q.Fu, T.A.Cross. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **28**, 235 (1999)
87. H.J.M.De Groot. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **10**, 593 (2000)
88. R.Tycko. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **52**, 575 (2001)
89. S.J.Opella, C.Ma, F.M.Marassi. *Methods Enzymol.*, **339**, 288 (2001)
90. *Perspectives on Solid State NMR in Biology.* (Eds S.R.Kiethne, H.J.M.De Groot). Kluwer Academic, Dordrecht, 2001
91. *Solid-State NMR Spectroscopy. Principles and Applications.* (Ed. M.J.Duer). Blackwell, Oxford, 2002
92. C.Glaubit, A.Watts. *J. Magn. Reson.*, **130**, 305 (1998)
93. C.Glaubit, I.J.Burnett, G.Gröbner, A.J.Mason, A.Watts. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 5787 (1999)
94. C.Glaubit. *Concepts Magn. Reson.*, **12**, 137 (2000)
95. R.R.Ketchum, K.-C.Lee, S.Huo, T.A.Cross. *J. Biomol. NMR*, **8**, 1 (1996)
96. R.R.Ketchum, B.Roux, T.A.Cross. *Structure*, **5**, 1655 (1997)
97. T.A.Cross, J.R.Quine. *Concepts Magn. Reson.*, **12**, 55 (2000)
98. J.R.Quine, T.A.Cross. *Concepts Magn. Reson.*, **12**, 71 (2000)
99. R.Bertram, J.R.Quine, M.S.Chapman, T.A.Cross. *J. Magn. Reson.*, **149**, 9 (2001)
100. M.Cotten, R.Fu, T.A.Cross. *Biophys. J.*, **76**, 1179 (1999)
101. B.Reif, C.P.Jaroniec, C.M.Rienstra, M.Hohwy, R.G.Griffin. *J. Magn. Reson.*, **151**, 320 (2001)
102. V.Ladizhansky, M.Veshkort, R.G.Griffin. *J. Magn. Reson.*, **154**, 317 (2002)
103. C.H.Wu, A.Ramamoorthy, S.J.Opella. *J. Magn. Reson., Ser. A*, **109**, 270 (1994)
104. A.Ramamoorthy, C.Wu, S.J.Opella. *J. Magn. Reson., Ser. B*, **107**, 88 (1995)
105. F.M.Marassi, A.Ramamoorthy, S.J.Opella. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 8551 (1997)
106. R.Fu, C.Tian, T.A.Cross. *J. Magn. Reson.*, **154**, 130 (2002)
107. J.R.Garbow, T.Gullion. In *Carbon-13 NMR Spectroscopy of Biological Systems.* Academic Press, San Diego, 1995. P. 65
108. R.G.Griffin. *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 508 (1998)
109. F.M.Marassi, S.J.Opella. *J. Magn. Reson.*, **144**, 150 (2000)
110. J.Wang, J.Denny, C.Tian, S.Kim, Y.Mo, F.Kovacs, Z.Song, K.Nishimura, Z.Gan, R.Fu, J.Quine, T.A.Cross. *J. Magn. Reson.*, **144**, 162 (2000)
111. F.M.Marassi. *Biophys. J.*, **80**, 994 (2001)
112. J.K.Denny, J.Wang, T.A.Cross, J.R.Quine. *J. Magn. Reson.*, **152**, 217 (2001)
113. M.Bak, R.Schultz, T.Vosegaard, N.C.Nielsen. *J. Magn. Reson.*, **154**, 28 (2002)
114. M.Bak, J.T.Rasmussen, N.C.Nielsen. *J. Magn. Reson.*, **147**, 296 (2000)
115. G.D.Henry, D.B.Sykes. *Methods Enzymol.*, **239**, 515 (1994)
116. R.R.Vold, R.S.Prosser, A.J.Deese. *J. Biomol. NMR*, **9**, 329 (1997)
117. A.Arora, F.Abildgaard, J.H.Bushweller, L.K.Tamm. *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 334 (2001)
118. V.Bystrov, A.Arseniev, I.Barsukov, A.Lomize. *Bull. Magn. Reson.*, **8**, 84 (1987)
119. R.R.Ketchum, W.Hu, T.A.Cross. *Science*, **261**, 1457 (1993)
120. F.Kovacs, J.Quine, T.A.Cross. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 7910 (1999)
121. F.M.Marassi, J.J.Gesell, A.P.Valente, Y.Kim, M.Oblatt-Montal, M.Montal, S.J.Opella. *J. Biomol. NMR*, **14**, 141 (1999)
122. S.J.Opella, F.M.Marassi, J.J.Gesell, A.P.Valente, Y.Kim, M.Oblatt-Montal, M.Montal. *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 374 (1999)
123. F.A.Kovacs, J.K.Denny, Z.Song, J.R.Quine, T.A.Cross. *J. Mol. Biol.*, **295**, 117 (2000)
124. Z.Song, F.A.Kovacs, J.Wang, J.K.Denny, S.C.Shekar, J.R.Quine, T.A.Cross. *Biophys. J.*, **79**, 767 (2000)
125. F.M.Marassi, C.Ma, H.Gratkowski, S.K.Strauss, M.Oblatt-Montal, M.Montal, S.J.Opella. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 14336 (1999)
126. F.M.Marassi, S.J.Opella, P.Juvvadi, R.B.Merrifield. *Biophys. J.*, **77**, 3152 (1999)
127. K.Valentine, S.-F.Liu, F.M.Marassi, G.Veglia, S.J.Opella, F.-X.Ding, S.-H.Wang, B.Arshava, J.M.Becker, F.Naider. *Biopolymers*, **59**, 243 (2001)
128. S.O.Smith, D.Song, S.Shekar, M.Groesbeek, M.Zilox, S.Aimoto. *Biochemistry*, **40**, 6553 (2001)
129. T.Vosegaard, N.C.Nielsen. *J. Biomol. NMR*, **22**, 225 (2002)
130. Y.Ishii, R.Tycko. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 1443 (2000)
131. J.W.Emsley, J.C.Lindon. *NMR Spectroscopy Using Liquid Crystal Solvents.* Pergamon Press, Oxford, 1975
132. A.D.Buckingham, K.A.McLauchlan. In *Progress in NMR Spectroscopy.* Pergamon Press, Oxford, 1967. P. 63
133. J.H.Prestegard, J.R.Tolman, H.M.Al-Hashimi, M.Andrec. In *Biological Magnetic Resonance: Structure Computation and Dynamics in Protein NMR. Vol. 17.* Kluwer Academic–Plenum, New York, 1999. P. 311
134. J.H.Prestegard, H.M.Al-Hashimi, J.R.Tolman. *Q. Rev. Biophys.*, **33**, 371 (2000)
135. J.H.Prestegard, A.I.Kishore. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5**, 584 (2001)
136. A.A.Bothner-By. In *Encyclopedia of NMR.* Wiley, Chichester, 1996. P. 2932
137. C.Gayathri, A.A.Bothner-By, P.C.M.van Zijl, C.MacLean. *Chem. Phys. Lett.*, **87**, 192 (1982)
138. A.A.Bothner-By, C.Gayathri, P.C.M.van Zijl, C.MacLean, J.J.Lai, K.M.Smith. *Magn. Reson. Chem.*, **23**, 935 (1985)
139. E.W.Bastian, C.MacLean, P.C.M.van Zijl, A.A.Bothner-By. *Annu. Rep. NMR Spectrosc.*, **19**, 35 (1987)
140. N.Tjandra, S.Grzesiek, A.Bax. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 6264 (1996)
141. N.Tjandra, J.G.Omichinski, A.M.Gronenborn, G.M.Clore, A.Bax. *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 732 (1997)
142. R.D.Beger, V.M.Marathias, B.F.Volkman, P.H.Bolton. *J. Magn. Reson.*, **135**, 256 (1998)
143. M.A.Contreras, J.Ubach, O.Millet, J.Rizo, M.Pons. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 8947 (1999)
144. R.R.Biekofsky, F.W.Muskett, J.M.Schmidt, S.R.Martin, J.P.Browne, P.M.Bayley, J.Feeney. *FEBS Lett.*, **460**, 519 (1999)
145. I.Bertini, I.C.Felli, C.Luchinat. *J. Biomol. NMR*, **18**, 347 (2000)
146. I.Bertini, M.B.L.Janik, G.Liu, C.Luchinat, A.Rosato. *J. Magn. Reson.*, **148**, 23 (2001)
147. J.Feeney, B.Birdsall, A.F.Bradbury, R.R.Biekofsky, P.M.Bayley. *J. Biomol. NMR*, **21**, 41 (2001)
148. R.Barbieri, I.Bertini, Y.M.Lee, C.Luchinat, A.H.Velders. *J. Biomol. NMR*, **22**, 365 (2002)
149. V.Gaponenko, A.Dvoretzky, C.Walsby, B.M.Hoffman, P.R.Rosevear. *Biochemistry*, **39**, 15217 (2000)
150. C.Ma, S.J.Opella. *J. Magn. Reson.*, **146**, 381 (2000)
151. A.Dvoretzky, V.Gaponenko, P.Rosevear. *FEBS Lett.*, **528**, 189 (2002)
152. L.W.Donaldson, M.R.Skrynnikov, W.-Y.Choy, D.R.Muhandiram, B.Sarkar, J.D.Forman-Kay, L.E.Kay. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 9843 (2001)
153. J.Boisbouvier, P.Gans, M.Blackledge, B.Brutscher, D.Marion. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 7700 (1999)
154. R.Barbieri, I.Bertini, G.Cavallaro, Y.M.Lee, C.Luchinat, A.Rosato. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 5581 (2002)
155. I.Bertini, M.Longinetti, C.Luchinat, G.Parigi, L.Sgheri. *J. Biomol. NMR*, **22**, 123 (2002)
156. I.Bertini, G.Cavallaro, M.Cosenza, R.Kummerle, C.Luchinat, M.Piccioli, L.Poggi. *J. Biomol. NMR*, **23**, 115 (2002)
157. I.Bertini, C.Luchinat, G.Parigi. *Solution NMR of Paramagnetic Molecules. Applications to Metallobiomolecules and Models.* Elsevier, Amsterdam, 2001
158. L.Banci, I.Bertini, J.G.Huber, C.Luchinat, A.Rosato. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 12903 (1998)
159. H.Demene, P.Tsan, P.Gans, D.Marion. *J. Phys. Chem. B*, **104**, 2559 (2000)

160. I.Bertini, F.Castellani, C.Luchinat, G.Martini, G.Parigi, S.Ristori. *J. Phys. Chem. B*, **104**, 10653 (2000)
161. F.Arnesano, L.Banci, I.Bertini, K.van der Wetering, M.Czisch. *J. Biomol. NMR*, **17**, 295 (2000)
162. C.W.Hilbers, C.MacLean. *NMR Basic Princ. Progr.*, **7**, 1 (1972)
163. T.M.Plantenga, B.H.Ruessink, C.Maclean. *Chem. Phys.*, **48**, 359 (1980)
164. A.D.Buckingham, K.A.McLauchlan. *Proc. Chem. Soc., London*, 144 (1963)
165. A.Peshkovsky, A.E.McDermott. *J. Phys. Chem. A*, **103**, 8604 (1999)
166. A.Peshkovsky, A.E.McDermott. *J. Magn. Reson.*, **147**, 104 (2000)
167. S.A.Riley, M.P.Augustine. *J. Phys. Chem. A*, **104**, 3326 (2000)
168. S.A.Riley, M.P.Augustine. *J. Magn. Reson.*, **144**, 288 (2000)
169. S.A.Riley, S.Vyas, M.P.Augustine. *Concepts Magn. Reson.*, **13**, 171 (2001)
170. R.S.Prosser, J.A.Losonczy, I.V.Shiyanovskaya. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 11010 (1998)
171. L.G.Barrientos, C.Dolan. *J. Biomol. NMR*, **16**, 329 (2000)
172. M.Ruckert, G.Otting. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 7793 (2000)
173. P.Ram, J.H.Prestegard. *Biochim. Biophys. Acta*, **940**, 289 (1988)
174. C.R.Sanders, J.P.Schwonek. *Biochemistry*, **31**, 8898 (1992)
175. C.R.Sanders, B.J.Hare, K.Howard, J.H.Prestegard. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **26**, 421 (1994)
176. C.R.Sanders, G.C.Landis. *Biochemistry*, **34**, 4030 (1995)
177. N.Tjandra, A.Bax. *J. Magn. Reson.*, **124**, 512 (1997)
178. A.Bax, N.Tjandra. *J. Biomol. NMR*, **10**, 289 (1997)
179. C.R.Sanders, R.S.Prosser. *Struct. Fold. Des.*, **6**, 1227 (1998)
180. K.P.Howard, S.J.Opella. *J. Magn. Reson., Ser. B*, **112**, 91 (1996)
181. J.J.Chou, J.D.Kaufman, S.J.Stahl, P.T.Wingfield, A.Bax. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 2450 (2002)
182. P.A.Luchette, T.N.Vetman, R.S.Prosser, E.W.Hancock, M.-P.Nieh, C.J.Glinka, S.Krueger, J.Katsaras. *Biochim. Biophys. Acta*, **1513**, 83 (2001)
183. J.A.Losonczy, J.H.Prestegard. *Biochemistry*, **37**, 706 (1998)
184. J.A.Losonczy, F.Tian, J.H.Prestegard. *Biochemistry*, **39**, 3804 (2000)
185. R.R.Vold, R.S.Prosser. *J. Magn. Reson., Ser. B*, **113**, 267 (1996)
186. K.J.Glover, J.A.Whiles, G.Wu, N.-J.Yu, R.Deems, J.O.Struppe, R.E.Stark, E.A.Komives, R.R.Vold. *Biophys. J.*, **81**, 2163 (2001)
187. J.Struppe, R.R.Vold. *J. Magn. Reson.*, **135**, 541 (1998)
188. M.Ottiger, A.Bax. *J. Biomol. NMR*, **12**, 361 (1998)
189. J.Struppe, E.A.Komives, S.S.Taylor, R.R.Vold. *Biochemistry*, **37**, 15523 (1998)
190. J.A.Losonczy, J.H.Prestegard. *J. Biomol. NMR*, **12**, 447 (1998)
191. C.R.Sanders, J.E.Schaff, J.H.Prestegard. *Biophys. J.*, **64**, 1069 (1993)
192. B.E.Ramirez, A.Bax. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 9106 (1998)
193. H.Wang, M.Eberstadt, E.T.Olejniczak, R.P.Meadows, S.W.Fesik. *J. Biomol. NMR*, **12**, 443 (1998)
194. S.Cavagnero, H.J.Dyson, P.E.Wright. *J. Biomol. NMR*, **13**, 387 (1999)
195. J.Struppe, J.A.Whiles, R.R.Vold. *Biophys. J.*, **78**, 281 (2000)
196. M.Ottiger, A.Bax. *J. Biomol. NMR*, **13**, 187 (1999)
197. M.Zweckstetter, A.Bax. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 3791 (2000)
198. G.Zandomenighi, M.Tomaselli, J.D.van Beek, B.H.Meier. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 910 (2001)
199. F.Picard, M.-J.Paquet, J.Levesque, A.Belanger, M.Auger. *Biophys. J.*, **77**, 888 (1999)
200. S.Gaemers, A.Bax. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 12343 (2001)
201. E.Brunner, M.R.Arnold, W.Kremer, H.R.Kalbitzer. *J. Biomol. NMR*, **21**, 173 (2001)
202. G.M.Clore, M.R.Starich, A.M.Gronenborn. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 10571 (1998)
203. C.R.Sanders, J.H.Prestegard. *Biophys. J.*, **58**, 447 (1990)
204. R.S.Prosser, S.A.Hunt, J.A.DiNatale, R.R.Vold. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 269 (1996)
205. R.S.Prosser, J.S.Hwang, R.R.Vold. *Biophys. J.*, **74**, 2405 (1998)
206. R.S.Prosser, V.B.Volkov, I.V.Shiyanovskaya. *Biophys. J.*, **75**, 2163 (1998)
207. R.S.Prosser, V.B.Volkov, I.V.Shiyanovskaya. *Biochem. Cell Biol.*, **76**, 443 (1998)
208. K.J.Crowell, P.M.Macdonald. *Biophys. J.*, **81**, 255 (2001)
209. R.S.Prosser, I.V.Shiyanovskaya. *Concepts Magn. Reson.*, **13**, 19 (2001)
210. M.-P.Nieh, C.J.Glinka, S.Krueger, R.S.Prosser, J.Katsaras. *Biophys. J.*, **82**, 2487 (2002)
211. G.Cho, B.M.Fung, V.B.Reddy. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 1537 (2001)
212. C.Tan, B.M.Fung, G.Cho. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 11827 (2002)
213. G.Veglia, S.J.Opella. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 11733 (2000)
214. B.W.Koenig, J.S.Hu, M.Ottiger, S.Bose, R.W.Hendler, A.Bax. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 1385 (1999)
215. J.Sass, F.Cordier, A.Hoffmann, M.Rogowski, A.Cousin. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 2047 (1999)
216. P.Bernado, R.Barbieri, E.Padros, C.Luchinat, P.Pons. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 374 (2002)
217. P.A.Luchette, R.S.Prosser, C.R.Sanders. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 1778 (2002)
218. M.R.Hansen, L.Mueller, A.Pardi. *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 1065 (1998)
219. M.R.Hansen, M.Rance, A.Pardi. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 11210 (1998)
220. M.R.Hansen, P.Hanson, A.Pardi. *Methods Enzymol.*, **317**, 220 (2000)
221. M.R.Hansen, P.Hanson, A.Pardi. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **11**, 365 (2000)
222. M.Zweckstetter, A.Bax. *J. Biomol. NMR*, **20**, 365 (2001)
223. D.D.Ojennus, R.M.Mitton-Fry, D.S.Wuttke. *J. Biomol. NMR*, **14**, 175 (1999)
224. L.G.Barrientos, J.M.Louis, A.M.Gronenborn. *J. Magn. Reson.*, **149**, 154 (2001)
225. J.-F.Trempe, F.G.Morin, Z.Xia, R.H.Marchessault, K.Gehring. *J. Biomol. NMR*, **22**, 83 (2002)
226. K.Fleming, D.Gray, S.Prasannan, S.Matthews. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 5224 (2000)
227. B.Deloche, E.T.Samulski. *Macromolecules*, **14**, 575 (1981)
228. R.Tycko, F.J.Blanco, Y.Ishii. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 9340 (2000)
229. H.J.Sass, G.Musco, S.J.Stahl, P.T.Wingfield, S.Grzesiek. *J. Biomol. NMR*, **18**, 303 (2000)
230. Y.Ishii, M.A.Markus, R.Tycko. *J. Biomol. NMR*, **21**, 141 (2001)
231. J.J.Chou, S.Gaemers, B.Howder, J.M.Louis, A.Bax. *J. Biomol. NMR*, **21**, 377 (2001)
232. H.Desvaux, J.C.P.Gabriel, P.Berthault, F.Camerel. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **40**, 373 (2001)
233. J.C.P.Gabriel, F.Camerel, B.J.Lemaire, H.Desvaux, P.Davidson, P.Batail. *Nature (London)*, **413**, 504 (2001)
234. G.M.Clore, M.R.Starich, C.H.Bewley, M.Cai, J.Kuszewski. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 6513 (1999)
235. A.Bax, G.Kontaxis, N.Tjandra. *Methods Enzymol.*, **339**, 127 (2001)
236. F.Kramer, B.Luy, S.J.Glaser. *Appl. Magn. Reson.*, **17**, 173 (1999)
237. B.Luy, S.J.Glaser. *J. Magn. Reson.*, **142**, 280 (2000)
238. B.Luy, S.J.Glaser. *J. Magn. Reson.*, **148**, 169 (2001)
239. F.Kramer, S.J.Glaser. *J. Magn. Reson.*, **155**, 83 (2002)
240. B.Luy, J.J.Barchi Jr., J.P.Marino. *J. Magn. Reson.*, **152**, 179 (2001)
241. P.Permi, A.Annila. *J. Biomol. NMR*, **16**, 221 (2000)
242. F.Cordier, A.J.Dingley, S.Grzesiek. *J. Biomol. NMR*, **13**, 175 (1999)
243. D.Yang, A.V.Venters, G.A.Mueller, W.Y.Choy, L.E.Kay. *J. Biomol. NMR*, **14**, 333 (1999)
244. P.Permi, P.R.Rosevear, A.Annila. *J. Biomol. NMR*, **17**, 43 (2000)
245. J.Evenäs, A.Mittermaier, D.Yang, L.E.Kay. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 2858 (2001)
246. L.Zidek, H.Wu, J.Feigon, V.Sklenar. *J. Biomol. NMR*, **21**, 153 (2001)
247. J.Yan, T.Corpora, P.Pradhan, J.H.Bushweller. *J. Biomol. NMR*, **22**, 9 (2002)
248. Z.Wu, A.Ono, M.Kainosho, A.Bax. *J. Biomol. NMR*, **19**, 361 (2001)
249. J.R.Tolman, J.H.Prestegard. *J. Magn. Reson., Ser. B*, **112**, 245 (1996)
250. J.R.Tolman, J.H.Prestegard. *J. Magn. Reson., Ser. B*, **112**, 269 (1996)
251. M.Ottiger, F.Delaglio, A.Bax. *J. Magn. Reson.*, **131**, 373 (1998)
252. Y.X.Wang, J.L.Marquardt, P.Wingfield, S.J.Stahl, S.Lee-Huang, D.A.Torchia, A.Bax. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 7385 (1998)
253. M.Ottiger, A.Bax. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 12334 (1998)

254. C.W. Vander Kooi, E.Kupce, E.R.Zuiderweg, M.Pellecchia. *J. Biomol. NMR*, **15**, 335 (1999)
255. G.Kontaxis, G.M.Clore, A.Bax. *J. Magn. Reson.*, **143**, 184 (2000)
256. B.Cutting, J.R.Tolman, S.Nanchen, G.Bodenhausen. *J. Biomol. NMR*, **23**, 195 (2002)
257. K.Ding, A.M.Gronenborn. *J. Magn. Reson.*, **158**, 173 (2002)
258. D.Yang, J.R.Tolman, N.K.Goto, L.E.Kay. *J. Biomol. NMR*, **12**, 325 (1998)
259. J.J.Chou, A.Bax. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 3844 (2001)
260. A.Mittermaier, L.E.Kay. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 6892 (2001)
261. A.W.Giesen, L.C.Bae, C.L.Barrett, J.A.Chyba, M.M.Chaykovsky, M.-C.Cheng, J.H.Murray, E.J.Oliver, S.M.Sullivan, J.M.Brown, F.W.Dahlquist, S.W.Homans. *J. Biomol. NMR*, **19**, 255 (2001)
262. A.W.Giesen, L.C.Bae, C.L.Barrett, J.A.Chyba, M.M.Chaykovsky, M.-C.Cheng, J.H.Murray, E.J.Oliver, S.M.Sullivan, J.M.Brown, S.W.Homans. *J. Biomol. NMR*, **22**, 21 (2002)
263. J.J.Chou, F.Delaglio, A.Bax. *J. Biomol. NMR*, **18**, 101 (2000)
264. T.Carlomagno, W.Peti, C.Griesinger. *J. Biomol. NMR*, **17**, 99 (2000)
265. A.Kaikkonen, G.Otting. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 1770 (2001)
266. G.Kontaxis, A.Bax. *J. Biomol. NMR*, **20**, 77 (2001)
267. P.Permi. *J. Magn. Reson.*, **153**, 267 (2001)
268. B.Brutscher, J.Boisbouvier, A.Pardi, D.Marion, J.P.Simorre. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 11845 (1998)
269. P.Vallurupalli, P.B.Moore. *J. Biomol. NMR*, **24**, 63 (2002)
270. E.de Alba, M.Suzuki, N.Tjandra. *J. Biomol. NMR*, **19**, 63 (2001)
271. P.Permi, A.Annila. *J. Biomol. NMR*, **20**, 127 (2001)
272. F.Tian, J.A.Losonczy, M.W.F.Fischer, J.H.Prestegard. *J. Biomol. NMR*, **15**, 145 (1999)
273. B.Brutscher. *J. Magn. Reson.*, **151**, 332 (2001)
274. P.Permi, S.Heikkinen, I.Kilpeläinen, A.Annila. *J. Magn. Reson.*, **139**, 273 (1999)
275. P.Permi. *J. Biomol. NMR*, **22**, 27 (2002)
276. M.Cai, Y.Huang, G.M.Clore. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 8642 (2001)
277. G.M.Clore, E.C.Murphy, A.M.Gronenborn, A.Bax. *J. Magn. Reson.*, **134**, 164 (1998)
278. T.Carlomagno, M.Hennig, J.R.Williamson. *J. Biomol. NMR*, **22**, 65 (2002)
279. F.Tian, P.J.Bolon, J.H.Prestegard. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 7712 (1999)
280. F.Tian, C.A.Fowler, E.R.Zartler, F.A.Jenney Jr., M.W.Adams. *J. Biomol. NMR*, **18**, 23 (2000)
281. Z.Wu, A.Bax. *J. Magn. Reson.*, **151**, 242 (2001)
282. M.Cai, H.Wang, E.T.Olejniczak, R.P.Meadows, A.H.Gunasekera, N.Xu, S.W.Fesik. *J. Magn. Reson.*, **139**, 451 (1999)
283. W.Peti, C.Griesinger. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 3975 (2000)
284. M.Pellecchia, C.W.Vander Kooi, K.Kelikuli, E.R.P.Zuiderweg. *J. Magn. Reson.*, **143**, 435 (2000)
285. F.Delaglio, Z.Wu, A.Bax. *J. Magn. Reson.*, **149**, 276 (2001)
286. G.Otting, M.Ruckert, M.H.Levitt, A.Moshref. *J. Biomol. NMR*, **16**, 343 (2000)
287. E.Brunner, J.Ogle, M.Wenzler, H.R.Kalbitzer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **272**, 694 (2000)
288. W.Y.Choy, M.Tollinger, G.A.Mueller, L.E.Kay. *J. Biomol. NMR*, **21**, 31 (2001)
289. Z.Wu, N.Tjandra, A.Bax. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 3617 (2001)
290. M.Ottiger, N.Tjandra, A.Bax. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 9825 (1997)
291. J.Boyd, C.Redfield. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 7441 (1999)
292. N.Tjandra, A.Bax. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 9576 (1997)
293. G.Cornilescu, J.L.Marquardt, M.Ottiger, A.Bax. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 6836 (1998)
294. G.Cornilescu, A.Bax. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 10143 (2000)
295. R.S.Lipsitz, N.Tjandra. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 11065 (2001)
296. I.Bertini, I.C.Felli, C.Luchinat. *J. Magn. Reson.*, **134**, 360 (1998)
297. L.Banci, I.Bertini, M.A.Cremonini, G.Gori-Savellini, C.Luchinat, K.Wuthrich, P.Guntert. *J. Biomol. NMR*, **12**, 553 (1998)
298. A.C.Liwan, A.Bax. *J. Magn. Reson.*, **127**, 54 (1997)
299. A.Mittermaier, L.E.Kay. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 10608 (1999)
300. A.Kjellberg, S.W.Homans. *J. Magn. Reson.*, **151**, 90 (2001)
301. G.M.Clore, A.M.Gronenborn. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 5891 (1998)
302. G.M.Clore, A.M.Gronenborn, N.Tjandra. *J. Magn. Reson.*, **131**, 159 (1998)
303. G.M.Clore, D.S.Garret. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 9008 (1999)
304. H.N.B.Moseley, G.T.Montelione. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **9**, 635 (1999)
305. N.Tjandra, J.Marquardt, G.M.Clore. *J. Magn. Reson.*, **142**, 393 (2000)
306. C.A.Fowler, F.Tian. *J. Mol. Biol.*, **304**, 447 (2000)
307. C.A.Rohl, D.Baker. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 2723 (2002)
308. F.Tian, H.Valafar, J.H.Prestegard. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 11791 (2001)
309. M.Zweckstetter, A.Bax. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 9490 (2001)
310. G.A.Mueller, W.Y.Choy, D.Yang, J.D.Forman-Kay, R.A.Venters, L.E.Kay. *J. Mol. Biol.*, **300**, 197 (2000)
311. C.D.Schwieters, G.M.Clore. *J. Magn. Reson.*, **149**, 239 (2001)
312. C.D.Schwieters, G.M.Clore. *J. Magn. Reson.*, **152**, 288 (2001)
313. P.Dosset, J.-C.Hus, D.Marion, M.Blackledge. *J. Biomol. NMR*, **20**, 223 (2001)
314. G.M.Clore, C.D.Schwieters. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **12**, 146 (2002)
315. A.Saupe. *Z. Naturforsch., A*, **19**, 161 (1964)
316. E.Brunner. *Concepts Magn. Reson.*, **13**, 238 (2001)
317. J.A.Mueller, W.Y.Choy, N.R.Skrynnikov, L.E.Kay. *J. Biomol. NMR*, **18**, 183 (2000)
318. G.M.Clore, A.M.Gronenborn, A.Bax. *J. Magn. Reson.*, **133**, 216 (1998)
319. G.M.Clore, A.M.Gronenborn, A.Szabo, N.Tjandra. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 4889 (1998)
320. E.de Alba, J.L.Baber, N.Tjandra. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 4282 (1999)
321. D.Fushman, R.Ghose, D.Cowburn. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 10640 (2000)
322. J.J.Warren, P.B.Moore. *J. Magn. Reson.*, **149**, 271 (2001)
323. J.C.Hus, J.J.Prompers, R.Bruschweiler. *J. Magn. Reson.*, **157**, 119 (2002)
324. M.Zweckstetter, A.Bax. *J. Biomol. NMR*, **23**, 127 (2002)
325. S.Moltke, S.Grzesiek. *J. Biomol. NMR*, **15**, 77 (1999)
326. H.J.Sass, G.Musco, S.J.Stahl, P.T.Wingfield, S.Grzesiek. *J. Biomol. NMR*, **21**, 275 (2001)
327. M.X.Fernandes, P.Bernad, M.Pons, J.G.de la Torre. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 12037 (2001)
328. A.Almond, J.Bunkenborg, F.Franch, C.H.Gotfredsen, J.Duus III. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 4792 (2001)
329. H.F.Azurmendy, C.A.Bush. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 2426 (2002)
330. K.Nomura, M.Kainosho. *J. Magn. Reson.*, **154**, 146 (2002)
331. J.Meiler, N.Blomberg, M.Nilges, C.Griesinger. *J. Biomol. NMR*, **16**, 245 (2000)
332. W.Peti, J.Meiler, R.Bruschweiler, C.Griesinger. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 5822 (2002)
333. N.R.Skrynnikov, L.E.Kay. *J. Biomol. NMR*, **18**, 239 (2000)
334. G.Lipari, A.Szabo. *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 4546 (1982)
335. G.Lipari, A.Szabo. *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 4559 (1982)
336. W.J.Wedemeyer, C.A.Rohl, H.A.Scheraga. *J. Biomol. NMR*, **22**, 137 (2002)
337. J.Meiler, J.J.Prompers, W.Peti, V.Griesinger, R.Bruschweiler. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 6098 (2001)
338. H.M.Al-Hashimi, H.Valafar, M.Terrell, E.R.Zartler, M.K.Eidsness, J.H.Prestegard. *J. Magn. Reson.*, **143**, 402 (2000)
339. J.C.Hus, R.Bruschweiler. *J. Biomol. NMR*, **24**, 123 (2002)
340. C.A.E.M.Spronk, J.P.Linge, C.W.Hilbers, G.W.Vuister. *J. Biomol. NMR*, **22**, 281 (2002)
341. P.Diehl. In *Accurate Molecular Structures*. Oxford University Press, London, 1992. P. 299
342. D.A.Case. *J. Biomol. NMR*, **15**, 95 (1999)
343. A.Annila, H.Aitio, E.Thulin, T.Drakenberg. *J. Biomol. NMR*, **14**, 223 (1999)
344. J.Meiler, W.Peti, C.Griesinger. *J. Biomol. NMR*, **17**, 283 (2000)
345. F.Delaglio, G.Kontaxis, A.Bax. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 2142 (2000)
346. M.Andrec, P.Du, R.M.Levy. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 1222 (2001)
347. M.Andrec, P.Du, R.M.Levy. *J. Biomol. NMR*, **21**, 335 (2001)

348. D.S.Garrett, J.Kuszewski, T.J.Hancock, P.J.Lodi, G.W.Vuister, A.M.Gronenborn, G.M.Clore. *J. Magn. Reson., Ser. B*, **104**, 99 (1994)
349. J.Kuszewski, A.M.Gronenborn, G.M.Clore. *J. Magn. Reson., Ser. B*, **107**, 293 (1995)
350. J.Kuszewski, J.Qin, A.M.Gronenborn, G.M.Clore. *J. Magn. Reson., Ser. B*, **106**, 92 (1995)
351. J.Kuszewski, A.M.Gronenborn, G.M.Clore. *J. Magn. Reson.*, **112**, 79 (1996)
352. J.Kuszewski, A.M.Gronenborn, G.M.Clore. *Protein Sci.*, **5**, 1067 (1996)
353. J.Kuszewski, A.M.Gronenborn, G.M.Clore. *J. Magn. Reson.*, **125**, 171 (1997)
354. J.Kuszewski, G.M.Clore. *J. Magn. Reson.*, **146**, 249 (2000)
355. G.M.Clore, J.Kuszewski. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 2866 (2002)
356. J.Kuszewski, C.Schwieters, G.M.Clore. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 3903 (2001)
357. N.Tjandra. *Struct. Fold. Des.*, **7**, R205 (1999)
358. J.C.Hus, D.Marion, M.Blackledge. *J. Mol. Biol.*, **298**, 927 (2000)
359. M.Allegrozzi, I.Bertini, M.B.L.Janik, Y.M.Lee, G.H.Lin, C.Luchinat. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 4154 (2000)
360. B.Simon, M.Sattler. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **41**, 437 (2002)
361. J.L.Baber, D.Libutti, D.Levens, N.Tjandra. *J. Mol. Biol.*, **289**, 949 (1999)
362. A.C.Drohat, N.Tjandra, D.M.Baldisseri, D.J.Weber. *Protein Sci.*, **8**, 800 (1999)
363. H.Aitio, A.Annala, S.Heikkinen, E.Thulin, T.Drakenberg, I.Kilpelainen. *Protein Sci.*, **8**, 2580 (1999)
364. Y.X.Wang, N.Neamati, J.Jacob, I.Palmer, S.J.Stahl, J.D.Kaufman, P.L.Huang, P.L.Huang, H.E.Winslow, Y.Pommier, P.T.Wingfield, S.Lee-Huang, A.Bax, Torchia D.A. *Cell*, **99**, 433 (1999)
365. B.Wu, S.Arumugam, G.Gao, G.Lee, V.Semenchenko, W.Huang, K.Brew, S.Van Doren. *J. Mol. Biol.*, **295**, 257 (2000)
366. B.E.Ramirez, O.N.Voloshin, R.D.Camerini-Otero, A.Bax. *Protein Sci.*, **9**, 2161 (2000)
367. E.Wasielewski, R.A.Atkinson, M.A.Abdallah, B.Kieffer. *Biochemistry*, **41**, 12488 (2002)
368. W.Gronwald, E.Brunner, F.Huber, M.Wenzler, C.Herrmann, H.R.Kalbitzer. *Protein Sci.*, **10**, 1260 (2001)
369. C.A.Bewley, K.Gustafson, M.Boyd, D.G.Covell, A.Bax, G.M.Clore, A.M.Gronenborn. *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 571 (1998)
370. L.G.Barrientos, R.Campos-Olivas, J.M.Louis, A.Fiser, A.Sali, A.M.Gronenborn. *J. Biomol. NMR*, **19**, 289 (2001)
371. E.de Alba, L.de Vries, M.G.Farquhar, N.Tjandra. *J. Mol. Biol.*, **291**, 927 (1999)
372. H.Schwalbe, S.B.Grimshaw, A.Spencer, M.Buck, J.Boyd, C.M.Dobson, C.Redfield, L.J.Smith. *Protein Sci.*, **10**, 677 (2001)
373. E.R.Zartler, F.E.Jenney Jr., M.Terrell, M.K.Eidsness, M.W.Adams, J.H.Prestegard. *Biochemistry*, **40**, 7279 (2001)
374. D.Shortle, M.S.Ackerman. *Science*, **293** (5529), 487 (2001)
375. M.S.Ackerman, D.Shortle. *Biochemistry*, **41**, 3089 (2002)
376. M.S.Ackerman, D.Shortle. *Biochemistry*, **41**, 13791 (2002)
377. J.L.Weaver, J.H.Prestegard. *Biochemistry*, **37**, 116 (1998)
378. J.A.Losoncz, M.Andrec, M.W.F.Fischer, J.H.Prestegard. *J. Magn. Reson.*, **138**, 334 (1999)
379. M.W.F.Fisher, J.A.Losoncz, J.L.Weaver, J.H.Prestegard. *Biochemistry*, **38**, 9013 (1999)
380. V.Tsui, L.Zhu, T.H.Huang, P.E.Wright, D.A.Case. *J. Biomol. NMR*, **16**, 9 (2000)
381. C.A.Bewley, G.M.Clore. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 6009 (2000)
382. C.A.Bewley. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 1014 (2001)
383. G.M.Clore, C.A.Bewley. *J. Magn. Reson.*, **154**, 329 (2002)
384. M.A.Markus, R.B.Gerstner, D.E.Draper, D.E.Torchia. *J. Mol. Biol.*, **292**, 375 (1999)
385. N.R.Skrynnikov, N.K.Goto, D.Yang, W.Y.Choy, J.R.Tolman, G.A.Mueller, L.E.Kay. *J. Mol. Biol.*, **295**, 1265 (2000)
386. P.M.Hwang, N.R.Skrynnikov, L.E.Kay. *J. Biomol. NMR*, **20**, 83 (2001)
387. J.Evenäs, V.Tugarinov, N.R.Skrynnikov, N.K.Goto, R.Muhandiram, L.E.Kay. *J. Mol. Biol.*, **309**, 961 (2001)
388. D.T.Braddock, M.Cai, J.L.Baber, Y.Huang, G.M.Clore. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 8634 (2001)
389. N.K.Goto, N.R.Skrynnikov, F.W.Dahlquist, L.E.Kay. *J. Mol. Biol.*, **308**, 745 (2001)
390. J.J.Chou, S.Li, C.B.Klee, A.Bax. *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 990 (2001)
391. T.K.Mal, N.R.Skrynnikov, K.L.Yap, L.E.Kay, M.Ikura. *Biochemistry*, **41**, 12899 (2002)
392. M.E.Stauffer, N.J.Skelton, W.J.Fairbrother. *J. Biomol. NMR*, **23**, 57 (2002)
393. H.Demene, T.Ducat, P.Barthe, M.A.Delsuc, C.Roumestand. *J. Biomol. NMR*, **22**, 47 (2002)
394. B.Stevensson, A.V.Komolkin, D.Sandstrom, A.Maliniak. *J. Chem. Phys.*, **114**, 2332 (2001)
395. D.J.Craik, J.A.Wilce. *Methods Mol. Biol. (Totowa, N.J.)*, **60**, 195 (1997)
396. B.W.Koenig. *ChemBiochem.*, **3**, 975 (2002)
397. H.Shimizu, A.Donohue-Rolfe, S.W.Homans. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 5815 (1999)
398. E.T.Olejniczak, R.P.Meadows, H.Wang, M.Cai, D.G.Nettesheim, S.W.Fesik. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 9249 (1999)
399. H.M.Al-Hashimi, P.J.Bolon, J.H.Prestegard. *J. Magn. Reson.*, **142**, 153 (2000)
400. P.J.Bolon, H.M.Al-Hashimi, J.H.Prestegard. *J. Mol. Biol.*, **293**, 107 (1999)
401. B.W.Koenig, D.C.Mitchell, S.Konig, S.Grzesiek, B.J.Litman, A.Bax. *J. Biomol. NMR*, **16**, 121 (2000)
402. B.W.Koenig, G.Kontaxis, D.C.Mitchell, J.M.Louis, B.J.Litman, A.Bax. *J. Mol. Biol.*, **322**, 441 (2002)
403. G.S.Thompson, H.Shimizu, S.W.Homans, A.Donohue-Rolfe. *Biochemistry*, **39**, 13153 (2000)
404. E.R.P.Zuiderweg. *Biochemistry*, **41**, 1 (2002)
405. G.M.Clore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 9021 (2000)
406. D.S.Garrett, Y.-J.Seok, A.Peterkofsky, A.M.Gronenborn, G.M.Clore. *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 166 (1999)
407. G.Wang, J.M.Louis, M.Sondej, Y.J.Scok, A.Peterkofsky, G.M.Clore. *EMBO J.*, **19**, 5635 (2000)
408. M.A.McCoy, D.F.Wyss. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 2104 (2002)
409. V.Gaponenko, A.S.Altieri, J.Li, R.A.Byrd. *J. Biomol. NMR*, **24**, 143 (2002)
410. M.Ottiger, A.Bax. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 4690 (1999)
411. M.Ottiger, F.Delaglio, J.L.Marquardt, N.Tjandra, A.Bax. *J. Magn. Reson.*, **134**, 365 (1998)
412. A.Mittermaier, L.E.Kay. *J. Biomol. NMR*, **23**, 35 (2002)
413. P.J.Bolon, J.H.Prestegard. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 9366 (1998)
414. T.Rundlof, C.Landersjo, K.Lycknert, A.Maliniak, G.Widmalm. *Magn. Reson. Chem.*, **36**, 773 (1998)
415. G.R.Kiddle, S.W.Homans. *FEBS Lett.*, **436**, 128 (1998)
416. S.W.Homans. *Biochem. Soc. Trans.*, **26**, 551 (1998)
417. M.Martin-Pastor, C.A.Bush. *Biochemistry*, **39**, 4674 (2000)
418. M.Martin-Pastor, C.A.Bush. *Carbohydr. Res.*, **323**, 147 (2000)
419. J.H.Prestegard, V.W.Miner, P.M.Tyrell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 7192 (1983)
420. P.Ram, L.Mazzola, J.H.Prestegard. *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 3176 (1989)
421. C.R.Sanders, J.H.Prestegard. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 1987 (1991)
422. C.R.Sanders, J.H.Prestegard. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 7096 (1992)
423. B.J.Hare, K.P.Howard, J.H.Prestegard. *Biophys. J.*, **64**, 392 (1993)
424. Y.Aubin, J.H.Prestegard. *Biochemistry*, **32**, 3422 (1993)
425. B.A.Salvatore, R.Ghose, J.H.Prestegard. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 4001 (1996)
426. K.P.Howard, J.H.Prestegard. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 3345 (1996)
427. K.P.Howard, J.H.Prestegard. *Biophys. J.*, **71**, 2573 (1996)
428. C.Landersjo, C.Hoog, A.Maliniak, G.Widmalm. *J. Phys. Chem. B*, **104**, 5618 (2000)
429. H.F.Azurmendi, M.Martin-Pastor, C.A.Bush. *Biopolymers*, **63**, 89 (2002)
430. H.F.Azurmendi, C.A.Bush. *Carbohydr. Res.*, **337**, 905 (2002)
431. T.N.Pham, T.Liptaj, K.Bromek, D.Uhrin. *J. Magn. Reson.*, **157**, 200 (2002)
432. K.Lycknert, A.Maliniak, G.Widmalm. *J. Phys. Chem. B*, **105**, 5119 (2001)

433. B.Stevensson, C.Landersjo, G.Widmalm, A.Maliniak. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 5946 (2002)
434. F.Tian, H.M.Al-Hashimi, J.L.Craighead, J.H.Prestegard. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 485 (2001)
435. H.Neubauer, J.Meiler, W.Peti, C.Griesinger. *Helv. Chim. Acta*, **84**, 243 (2001)
436. A.Almond, J.Duus III. *J. Biomol. NMR*, **20**, 351 (2001)
437. M.Martin-Pastor, C.A.Bush. *J. Biomol. NMR*, **19**, 125 (2001)
438. M.Staaf, C.Hoog, B.Stevensson, A.Maliniak, G.Widmalm. *Biochemistry*, **40**, 3623 (2001)
439. D.I.Freedberg. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 2358 (2002)
440. J.H.Prestegard, J.Glushka. In *NMR of Glyco-Conjugates*. (Eds J.Jimenez-Barbero, T.Peters). Wiley, New York, 2002
441. H.Zhou, A.Vermeulen, F.M.Jucker, A.Pardi. *Biopolymers*, **52**, 168 (1999)
442. D.MacDonald, P.Lu. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **12**, 337 (2002)
443. E.T.Mollova, A.Pardi. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **10**, 298 (2000)
444. L.Zidek, R.Steff, V.Sklenar. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **11**, 275 (2001)
445. P.Bayer, L.Varani, G.Varani. *J. Biomol. NMR*, **14**, 149 (1999)
446. N.Tjandra, S.Tate, A.Ono, M.Kainosho, A.Bax. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 6190 (2000)
447. L.Trantirek, M.Urbasek, R.Steff, J.Feigon, V.Sklenar. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 10454 (2000)
448. H.M.Al-Hashimi, J.R.Tolman, A.Majumdar, A.Gorin, D.J.Patel. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 5806 (2001)
449. A.Majumdar, D.J.Patel. *Acc. Chem. Res.*, **35**, 1 (2002)
450. A.Vermeulen, H.Zhou, A.Pardi. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 9638 (2000)
451. E.T.Mollova, M.R.Hansen, A.Pardi. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 11561 (2000)
452. K.Bondensgaard, E.T.Mollova, A.Pardi. *Biochemistry*, **41**, 11532 (2002)
453. H.M.Al-Hashimi, A.Majumdar, A.Gorin, A.Kettani, E.Skripkin, D.J.Patel. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 633 (2001)
454. S.R.Lynch, J.D.Puglisi. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 7853 (2000)
455. M.Hennig, T.Carlomagno, J.R.Williamson. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 3395 (2001)
456. Z.Wu, N.Tjandra, A.Bax. *J. Biomol. NMR*, **19**, 367 (2001)
457. B.Luy, J.P.Marino. *J. Biomol. NMR*, **20**, 39 (2001)
458. K.Huang, J.M.Louis, L.Donaldson, F.-L.Lim, A.D.Sharrock, G.M.Clore. *EMBO J.*, **19**, 2615 (2000)
459. J.Kikuchi, I.Iwahara, T.Kigawa, Y.Murakami, T.Okazaki, S.Yokoyama. *J. Biomol. NMR*, **22**, 333 (2002)
460. D.T.Braddock, J.M.Louis, J.L.Baber, D.Levens, G.M.Clore. *Nature (London)*, **415**, 1051 (2002)
461. H.M.Al-Hashimi, A.Gorin, A.Majumdar, D.J.Patel. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 3179 (2001)
462. H.M.Al-Hashimi, A.Gorin, A.Majumdar, Y.Gosser, D.J.Patel. *J. Mol. Biol.*, **318**, 637 (2002)
463. J.J.Warren, P.B.Moore. *J. Biomol. NMR*, **20**, 311 (2001)
464. S.H.Bae, H.K.Cheong, J.H.Lee, C.Cheong, M.Kainosho, B.S.Choi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 10602 (2001)
465. N.Sibille, A.Pardi, J.P.Simorre, M.Blackledge. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 12135 (2001)
466. P.Padrta, R.Steff, L.Kralik, L.Zidek, V.Sklenar. *J. Biomol. NMR*, **24**, 1 (2002)
467. J.R.Tolman, J.M.Flanagan, M.A.Kennedy, J.H.Prestegard. *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 292 (1997)
468. L.E.Kay. *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 513 (1998)
469. J.R.Tolman, H.M.Al-Hashimi, L.E.Kay, J.H.Prestegard. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 1416 (2001)
470. L.Wang, Y.Pang, T.Holder, J.R.Brender, A.V.Kurochkin, E.R.P.Zuiderweg. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 7684 (2001)
471. H.M.Al-Hashimi, Y.Gosser, A.Gorin, W.Hu, A.J.Majumdar, D.J.Patel. *J. Mol. Biol.*, **315**, 95 (2002)
472. J.R.Tolman. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 12020 (2002)
473. A.Bax, J.J.Chou, B.E.Ramirez. In *Encyclopedia of NMR. Vol. 9*. (Eds D.M.Grant, R.K.Harris). Wiley, Chichester, 2002. P. 401
474. J.H.Prestegard, N.U.Jain, S.B.Leverly. In *Encyclopedia of NMR. Vol. 9*. (Eds D.M.Grant, R.K.Harris). Wiley, Chichester, 2002. P. 441
475. E.de Alba, N.Tjandra. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **40**, 175 (2002)
476. M.Schneider, D.E.Demco, B.Blumich. *Macromolecules*, **34**, 4019 (2001)
477. C.Boesch, R.Kreis. *NMR Biomed.*, **14**, 140 (2001)
478. M.L.Mattinen, K.Paakkonen, T.Ikonen, J.Craven, T.Drakenberg, R.Serimaa, J.Waltho, A.Annila. *Biophys. J.*, **83**, 1177 (2002)
479. Я.В.Зубавичус, Ю.Л.Словохотов. *Успехи химии*, **70**, 429 (2001)
480. E.L.Ulrich, I.L.Markley, Y.Kyogoku. *Protein Seq. Data Anal.*, **2**, 23 (1989)
481. M.Suzuki, R.J.Youle, N.Tjandra. *Cell*, **103**, 645 (2000)
482. J.D.Swarbrick, T.Bashtannyk, D.Maksel, X.R.Zhang, G.M.Blackburn, K.R.Gayler, P.R.Gooley. *J. Mol. Biol.*, **302**, 1165 (2000)
483. J.J.Chou, S.Li, A.Bax. *J. Biomol. NMR*, **18**, 217 (2000)
484. D.MacDonald, K.Herbert, X.Zhang, T.Polgruto, P.Lu. *J. Mol. Biol.*, **306**, 1081 (2001)
485. C.C.Cornilescu, F.Bouamr, X.Yao, C.Carter, N.Tjandra. *J. Mol. Biol.*, **306**, 783 (2001)
486. M.Cai, Y.Huang, R.Ghirlando, K.L.Wilson, R.Cragie, G.M.Clore. *EMBO J.*, **20**, 4399 (2001)
487. S.Saha, J.Boyd, J.M.Werner, V.Knott, P.A.Handford, I.D.Campbell, A.K.Downing. *Structure*, **9**, 451 (2001)
488. E.Ab, G.K.Schuurman-Wolters, D.Nijlant, K.Dijkstra, M.H.Saier, G.T.Robillard, R.M.Scheek. *J. Mol. Biol.*, **308**, 993 (2001)
489. K.Schweimer, S.Hoffmann, F.Bauer, U.Friedrich, C.Kardinal, S.M.Feller, B.Biesinger, H.Sticht. *Biochemistry*, **41**, 5120 (2002)
490. W.Gronwald, F.Huber, P.Grunewald, M.Sporner, S.Wohlgemuth, C.Herrmann, H.R.Kalbitzer. *Structure*, **9**, 1029 (2001)
491. L.Yu, A.H.Gunasekera, J.Mack, E.T.Olejniczak, L.E.Chovan, X.Ruan, D.L.Towne, C.G.Lerner, S.W.Fesik. *J. Mol. Biol.*, **311**, 593 (2001)
492. E.C.Murphy, V.B.Zhurkin, J.M.Louis, G.Cornilescu, G.M.Clore. *J. Mol. Biol.*, **312**, 481 (2001)
493. D.T.Braddock, J.L.Baber, D.Levens, G.M.Clore. *EMBO J.*, **13**, 3476 (2002)
494. G.Cornilescu, B.R.Lee, C.C.Cornilescu, G.Wang, A.Peterkofsky, G.M.Clore. *J. Biol. Chem.*, **277**, 42289 (2002)
495. T.C.Leeper, M.B.Martin, H.Kim, S.Cox, V.Semenchenko, F.J.Schmidt, S.R.Van Doren. *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 397 (2002)
496. J.Weigelt, S.E.Brown, C.S.Miles, N.E.Dixon, G.Otting. *Struct. Fold. Des.*, **7**, 681 (1999)
497. I.Bertini, A.Donare, B.Jimenez, C.Luchinat, G.Parigi, M.Piccioli, L.Poggi. *J. Biomol. NMR*, **21**, 85 (2001)
498. B.Pan, B.Li, S.J.Russell, J.Y.K.Tom, A.G.J.Cochran, W.J.Fairbrother. *J. Mol. Biol.*, **316**, 769 (2002)
499. J.Iwahara, M.Iwahara, G.W.Daughdrill, J.Ford, R.T.Clubb. *EMBO J.*, **21**, 1197 (2002)
500. O.N.Pakhomova, S.Deep, Q.Huang, C.Zwieb, A.P.Hinck. *J. Mol. Biol.*, **317**, 145 (2002)
501. K.Ye, A.Serganov, W.Hu, M.Garber, D.J.Patel. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 5182 (2002)
502. L.G.Barrientos, J.M.Louis, I.Botos, T.Mori, Z.Han, B.R.O'Keefe, M.R.Boyd, A.Wlodawer, A.M.Gronenborn. *Structure*, **10**, 673 (2002)
503. J.Kuszewski, A.M.Gronenborn, G.M.Clore. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 2337 (1999)
504. E.C.Johnson, G.A.Lazar, J.R.Desjarlais, T.M.Handel. *Struct. Fold. Des.*, **7**, 967 (1999)
505. M.Cai, Y.Huang, R.Zheng, S.-Q.Wei, R.Guirlando, M.S.Lee, R.Craigie, A.M.Gronenborn, G.M.Clore. *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 903 (1998)
506. B.F.Volkman, S.J.Wilkens, W.M.Westler, A.L.Lee, R.Beger, B.Xia, J.L.Markley. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 4677 (1999)
507. K.Paakkonen, T.Sorsa, T.Drakenberg, P.Pollesello, C.Tilgmann, P.Permi, S.Heikkinen, I.Kilpelainen, A.Annila. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 6665 (2000)
508. J.C.Amor, R.D.Seidel III, F.Tian, R.A.Kahn, J.H.Prestegard. *J. Biomol. NMR*, **23**, 253 (2002)

3D STRUCTURE DETERMINATION OF WEAKLY ORIENTED BIOMOLECULES BY NMR SPECTROSCOPY

A.A.Shahkhatuni, A.G.Shahkhatuni

*Molecular Structure Research Centre, National Academy of Sciences of Republic of Armenia
26, Prosp. Azatutyan, 375014 Yerevan, Republic of Armenia, Fax 374(1)28–1380*

The key achievements and capacities of NMR spectroscopy of weakly oriented biomolecules are considered. Due to slight orientation, it becomes possible to define a number of NMR parameters dependent on the orientation of biomolecules, which are averaged to zero in usual isotropic media. The addition of new orientational constraints to standard procedures of 3D structure determination markedly increases the achievable accuracy. The possibility of structure determination for biomolecules using only orientation-dependent parameters without invoking other NMR data is discussed. The methods of orientation, experimental techniques, and calculation methods are systematised. The main results obtained and the prospects of using NMR spectroscopy of weakly oriented systems to study different classes of biomolecules and to solve various problems of molecular biology are analysed. Examples of biomolecules whose structures have been determined using orientation-dependent parameters are given.

Bibliography — 508 references.

Received 26th July 2002