

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.322

КРИСТАЛЛОГРАФИЧЕСКИЕ И ЯМР-СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЕ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ: МЕЖОСТАТОЧНЫЕ КОНТАКТЫ

© 2012 г. Л. В. Абатуров*, Н. Г. Носова

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

Поступила в редакцию 03.05.2011 г.

Принята к печати 10.06.2011 г.

Межостаточные парные контакты проанализированы детально для четырех пар белковых структур, определенных с помощью рентгеноструктурного анализа (РСА) и ядерного магнитного резонанса (ЯМР). На расстояниях межостаточных контактов ≤ 4.0 Å в четырех ЯМР-структурах общее количество парных контактов меньше на 4–9%, и парные контакты в среднем короче на 0.02–0.16 Å по сравнению с РСА-структурами. В каждой из четырех структурных пар присутствует 83–94% общих контактных пар (ОПК), образуемых в обеих структурах одними и теми же остатками; остальные 6–17% – более длинные собственные парные контакты (СПК) – образованы различными остатками в ЯМР- и РСА-структурах, причем число СПК больше в РСА-структурах. В каждой ЯМР-структуре присутствует три типа ОПК: короче, длиннее или такой же длины, как эти же контактные пары в РСА-структуре того же белка. Методологически различающиеся укороченные ОПК преобладают на известной дистанционной зависимости плотности межостаточных контактов в 60–61 парах ЯМР/РСА-структур. Среди анализируемых четырех пар структур укорачивание контактов происходит при энергетической минимизации ЯМР-структуры крамбина и при решении программой X-PLOR с уменьшенными ван-дер-ваальсовыми радиусами атомов ЯМР-структур убиквитина, лизоцима кур и мономерного гемоглобина. Степень укорачивания контактов в ЯМР-структурах уменьшается с увеличением количества ЯМР-информации при решении этих структур. Среди 60 пар ЯМР/РСА-структур основное отличие между α -спиральными и β -структурными белками на зависимостях от длин межостаточных расстояний средней плотности контактов возникает из-за сильных α/β различий в локальной геометрии остова.

Ключевые слова: пространственные структуры белков, рентгеноструктурный анализ, ядерный магнитный резонанс, межостаточные контакты, методологические различия, α/β структурные различия.

CRYSTALLOGRAPHIC AND NMR SPECTROSCOPIC PROTEIN STRUCTURES: THE INTERRESIDUE CONTACTS, by L. V. Abaturov*, N. G. Nosova (Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; *e-mail: aba@eimb.ru). Inter-residue pair contacts have been analyzed in detail for the four pairs of protein structures determined both by X-ray analysis (X-ray) and nuclear magnetic resonance (NMR). At contact distances ≤ 4.0 Å in the four NMR structures the overall number of pair contacts are less by 4–9% and pair contacts are in average shorter by 0.02–0.16 Å than those in corresponding X-ray structures. In each of four structure pairs 83–94% of common pair contacts are formed by the same residues in both structures and rest 6–17% ones are longer own pair contacts formed by the different residues in the NMR and X-ray structures. The amount of the longer own contacts is higher in the X-ray structure of the pair. In the each NMR structure there are three types of common pair contacts, which are shorter, longer or equal length in comparison with identical pair contacts in the X-ray structure of the same protein. The methodological different shortened common pair contacts predominate in the known distant dependence of the inter-residue contact densities of the 60–61 pair of the NMR/X-ray structure. Among four pairs analyzed the contact shortening proceeds upon the energy minimization of the crambin NMR structure and upon the resolving by the program X-PLOR with decreased atom van der Waals radius of the NMR structures of ubiquitin, hen lysozyme and monomeric hemoglobin. An extent of the NMR contact shortening decreased as the amount of NMR information upon the calculation of the NMR structures increased. Among 60–61 pairs of NMR/X-ray structures the main difference between α -helical and β -structural proteins on the inter-residue distant dependence of the average contact densities arises from the strong α/β difference in the local backbone geometry.

Keywords: 3D-protein structures, X-ray analysis, nuclear magnetic resonance, inter-residue contacts, methodological difference, α/β structural difference.

Принятые сокращения: Нб – мономерный гемоглобин *Glycera dibranchiate*; RMSD – среднеквадратичные отклонения; ПК – парные контакты; ВПК – переменные общие ПК; ИПК – идентичные общие ПК; КМ – крамбин; ЛЗК – лизоцим кур; ОПК – общие ПК; СПК – собственные ПК; УБ – убиквитин; ЯЭО – ядерный эффект Оверхаузера.

* Эл. почта: aba@eimb.ru

ВВЕДЕНИЕ

Описание первой кристаллической структуры белка — миоглобина кашалота, исследованной рентгеноструктурным анализом (РСА), — появилось полвека тому назад, а через 25 лет с атомарным разрешением — структуры белков инсектосина скорпиона и ингибитора протеиназы методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) [1, 2]. Тогда же, исходя из РСА-структур крамбина (КМ) и панкреатического ингибитора трипсина, была имитирована сетка межпротонных расстояний, которая могла бы появиться при определении ЯМР-структур этих белков в растворе [3, 4]. К настоящему времени среди структур, депонированных в Protein Data Bank (PDB), 15% составляют ЯМР-структуры [5]. Потребность в ЯМР-исследованиях структуры белков сильно возросла за последние годы и распространилась на определенные структуры *in vivo* — в живой клетке [6, 7]. Об этом свидетельствует и появление нескольких локальных программ Структурной Геномики или Протеомики, в которых концентрируются результаты сравнительного анализа достаточно большого количества ЯМР- и РСА-структур белков [8]. В 2005 г. Галзитская и соавт. опубликовали результаты детального сравнительного анализа межостаточных контактов в ЯМР- и РСА-структурах 60/61 негомологичных глобулярных белков [9, 10]. 30 из этих структур затем включили в набор 148 РСА- и ЯМР-структур с разными подходами к анализу различий между ЯМР- и РСА-структурами и поиску возможных причин этих различий [11]. За последние годы опубликовано и несколько других работ с анализом большого количества ЯМР- и РСА-структур, в которых обсуждены и результаты Галзитской и соавт. [12–18].

Основное отличие использованного нами метода совместного анализа контактов в РСА- и ЯМР-структурах состоит в сравнении парных контактов (ПК), образуемых в обеих структурах белка одинаковыми или разными остатками, а не общего количества межостаточных контактов в различных областях молекулы белка и у атомов разных групп остатков. Проведенный таким образом детальный анализ четырех пар ЯМР/РСА-структур позволяет предложить интерпретацию одного из основных результатов анализа 60/61 пар структур на основании следующих положений. В области прямых межостаточных контактов $\leq 4.0 \text{ \AA}$ их общее количество меньше, и они в среднем короче в ЯМР-структурах. Среди этих контактов преобладают, около 90%, общие ПК (ОПК) между одними и теми же остатками в РСА- и ЯМР-структурах. Уменьшение их длины происходит на стадии энергетической минимизации ЯМР-структур и при их решениях с уменьшенными ван-дер-ваальсовыми радиусами атомов программы X-PLOR. Такое уменьшение длины при-

водит к смещению в направлении более коротких расстояний плотности межостаточных контактов в ЯМР-структурах при сравнении этого параметра для 60/61 пар ЯМР/РСА-структур. Различия между ЯМР- и РСА-структурами сокращаются с увеличением количества ЯМР-информации, но определенные различия могут сохраняться из-за локальной деформации среднестатистической “растворной” структуры межмолекулярными кристаллическими контактами. Основные общие отличия в дистанционной зависимости контактной плотности между белками с α -спиралями и β -структурами возникают из-за значительных различий в локальной геометрии остова — плотно скрученной в α -спиралях и вытянутой β -структурах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Координаты кристаллических и “растворных” ЯМР-структур КМ, убиквитина (УБ), мономерного гемоглобина *Glycera dibranchiata* (Hb) и лизоцима кур (ЛЗК) взяты из базы данных PDB [19]. Анализ структур проводили с использованием программ: PROCHECK, WHAT IF CHECK, MolMol. Для попарного сравнения РСА- и ЯМР-структур четырех белков определены межостаточные парные контакты (ПК), которые присутствуют только в РСА- и ЯМР-структурах белка — собственные ПК (СПК) РСА-структур и ЯМР-структур и общие ПК (ОПК), образуемые одинаковой парой остатков в РСА- и ЯМР-структурах. Среди ОПК выделены группы идентичных ПК (ИПК) с одинаковыми контактирующими атомами и переменные ПК (ВПК) с отличающимися контактирующими атомами. ВПК разделены на две группы: не смешанные ВПК с разными контактирующими атомами, но с одинаковым типом контактирующих групп (атомов остова или боковых групп в РСА- и ЯМР-структурах) и смешанных ВПК со взаимными заменами контактирующих групп остова и боковых групп в РСА- и ЯМР-структурах. На основании такого анализа сформированы три группы ОПК РСА- и ЯМР-структур: остов–остов, остов–боковая группа и боковая группа–боковая группа. Каждая из анализируемых групп ОПК делилась также на три группы на основании средних длин $\langle d \rangle$ контактов в ЯМР- и РСА-структурах, уменьшения, увеличения и отсутствия изменений в ЯМР-структуре. Из этих трех групп для сравнительного анализа различных контактов и структур выделялась преобладающая по размерам группа ПК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ четырех пар РСА- и ЯМР-структур

Белки этих четырех пар структур отличаются размерами: от 46 до 147 остатков, — вторичной структурой: от преимущественно β -структуриро-

ванного УБ до α -спирального Нб – и качеством решения РСА- и ЯМР-структур, которое может быть охарактеризовано распределением остова остатков по карте Рамачандрана (в %, табл. 1) и параметрами программы WHAT IF в сравнении с наборами из 489 РСА- и 545 ЯМР-структур (табл. 2) [16, 20]. Для РСА- и ЯМР-структур величины параметров Z этой программы определяются величиной отклонений от средней величины для хорошо решенных РСА-структур, имеющихся в базе PDB при проведении расчетов параметров Z . Отрицательные и положительные отклонения показывают, что распределение величин конкретных параметров в анализируемой структуре соответственно хуже или лучше, чем среднее для РСА-структур.

Из четырех ЯМР структур положительные величины всех четырех параметров Z найдены только в структуре УБ. У трех других ЯМР-структур: КМ, Нб и ЛЗК – все четыре параметра Z , кроме 2nd у КМ, отрицательные, как и в среднем у 545 ЯМР-структур (табл. 2). Абсолютные значения этих параметров снижаются (т.е. становятся “более положительными”) после уточнения этих структур в окружении воды, но при этом остаются отрицательными по величине [16]. В ЯМР-структуре УБ все параметры Z попадают в интервал величин 489 РСА-структур (табл. 2); количество коротких контактов близко к их числу в РСА-структуре УБ и в 5 раз меньше, чем в среднем у 545 ЯМР-структур. В структуре УБ в 2–3 раза больше экспериментальных дистанционных ограничений ЯЭО, чем у ЯМР-структур трех других белков и в три раза больше, чем в среднем у 97 ЯМР-структур, а RMSD атомов остова РСА-структуры в 1.6–2.5 раза меньше, чем у трех других структур, и в отличие от них содержание регулярной структуры незначительно, на 1%, уменьшается в ЯМР-структуре (табл. 2).

	КМ		УБ		Нб		ЛЗК	
	n	$\langle d \rangle, \text{Å}$	n	$\langle d \rangle, \text{Å}$	n	$\langle d \rangle, \text{Å}$	n	$\langle d \rangle, \text{Å}$
РСА	169	3.31 ± 0.32	268	3.36 ± 0.30	640	3.31 ± 0.30	525	3.28 ± 0.34
ЯМР	163	3.25 ± 0.32	250	3.32 ± 0.33	600	3.15 ± 0.37	482	3.26 ± 0.35

Как это характерно для ЯМР-структур больших групп белков, у этих четырех в интервале $\leq 4.0 \text{ Å}$ количество всех ПК (n) и их средняя длина (d) меньше, чем у РСА-структур (табл. 1 и в тексте) [24]. Результаты анализа четырех пар РСА/ЯМР-структур белков позволяют предполагать, что существует две наиболее общих причины уменьшения средней длины межостаточных ПК в ЯМР-структурах. Одна из них может быть связана с уменьшением средней длины в процессе энергетической

минимизации на заключительных стадиях решения ЯМР-структур при недостатке энергии дистанционных ограничений ЯЭО. Другая причина состоит в использовании при решении ЯМР-структур УБ, Нб и ЛЗК программы X-PLOR, в которой ван-дер-ваальсовы радиусы атомов уменьшены до 0.8 от стандартных величин силового поля CHARMM [25]. Это уменьшение приводит к уменьшению средних длин межостаточных контактов в ЯМР-структурах УБ, Нб и ЛЗК (как и других белков), что проявляется и в увеличении количества коротких межостаточных контактов в этих ЯМР-структурах, определяемых программой WHAT IF с приведением к стандартным CHARMM величин ван-дер-ваальсовых радиусов атомов (табл. 2) [25]. В приведенное уменьшение общего количества ПК с расстоянием $\leq 4.0 \text{ Å}$ в ЯМР-структурах основной вклад вносит уменьшение возможности обнаружения в спектрах ЯМР прямых межостаточных контактов – ЯЭО с увеличением межпротонных расстояний от < 3 до 4 Å и более [26].

При решении ЯМР-структур увеличение энергии экспериментальных ограничений уменьшает степень смещения энергетически минимизируемой ЯМР-структуры от РСА-структуры. Так, при решении ЯМР-структуры ЛЗК с увеличением энергии дистанционных ограничений при увеличении количества ЯЭО в 1.4 раза: от ~ 9 до 12.6 на остаток – и включением дополнительно дипольных ограничений (остаточных диполь-дипольных взаимодействий) в количестве 1.6 на остаток значение величины RMSD атомов остова ЯМР-структуры относительно РСА-структуры уменьшилось от 2.33 до 1.49 Å, а доля остатков, заполняющих наиболее предпочтительную область карты Рамачандрана, увеличилась с 54.5 до 74.2%. Сильно сократились и величина RMSD ЯМР-структуры относительно идеализованной геометрии длин и углов ковалентных связей [23]. В ЯМР-структуре УБ в 3 раза больше количество ЯЭО и дипольных ограничений: 35.9 и 4.9 на остаток, – и с этим сочетается уменьшение величины RMSD атомов остова относительно РСА-структуры до 0.45 Å, сохранение всей регулярной структуры и смещение всех параметров Z программы WHAT IF в интервал величин для 489 РСА-структур и близкое к этому интервалу количество коротких контактов в расчете на 100 остатков (табл. 2). Качество ЯМР-структуры УБ рассматривали как эквивалентное РСА-структуре с разрешением 1.4 Å [27]. Среди ЯМР-структур четырех белков наибольшее количество коротких контактов зарегистрировано в структуре Нб (табл. 2), причем средняя длина всех межостаточных ПК этого белка на 0.16 Å короче, чем в его РСА-структуре. В ЯМР/РСА-структурах трех других белков эта разница составляет 0.02–0.06 Å (табл. 1).

Таблица 1. РСА- и “растворные” ЯМР-структуры крамбина, убиквитина, мономерного гемоглобина *Spuseta dibranchiata* и лизоцима кур

Структура	PDB, №	Метод	Разрешение, Å	R-фактор, %	ПК ^а		СПК ^б		ОПК ^в		ИПК ^г		ВПК ^д		ПРОСЧЕК ^е					
					n	<d>, Å	n	%	<d>, Å	n	<d>, Å	n	%	<d>, Å	n	<d>, Å	Кор-область, %	Разрешенная доплотительная область, %	Разрешенная в общем область, %	Неразрешенная область, %
Крамбин	1CRN	РСА	1.5	11.4	169	3.31	17	10	3.64	152	3.27	104	68	3.23	48	3.38	94.3	5.7	0	0
Крамбин (средние значения для 8 структур)	1CCN	ЯМР			163	3.25	11	6.8	3.60	3.22			3.19			3.28	91.4	8.6	0	0
Убиквитин	1UBQ	РСА	1.8	17.6	268	3.36	32	12	3.71	236	3.31	194	82	3.27	42	3.48	95.5	4.4	0	0
Убиквитин (№1 из набора 10 структур)	1D3Z	ЯМР			250	3.32	14	6	3.69	3.30			3.27			3.44	98.5	1.5	0	0
Гемоглобин	1JF4	РСА	1.4	18.9	640	3.31	74	11	3.54	566	3.28	384	68	3.23	182	3.37	94.4	4.8	0.8	0
Гемоглобин (средние значения для 29 структур)	1VRF	ЯМР			600	3.15	34	5.5	3.47	3.13			3.13			3.15	83.1	14.5	0.8	1.6
Лизоцим	193L	РСА	1.33	18.45	525	3.28	91	17	3.50	434	3.24	272	63	3.20	162	3.30	87.6	12.4	0	0
Лизоцим (№1 из набора 50 структур)	1E8L	ЯМР			482	3.26	48	10	3.50	3.24			3.19			3.32	74.2	23.9	1.8	0

^аПК — количество *n* и средняя длина *<d>* всех нековалентных парных контактов с расстоянием ≤ 4.0 Å в РСА- и ЯМР-структурах.

^бСПК — количество *n*, доля в % и средняя длина *<d>* собственных парных контактов, присутствующих только в РСА- и ЯМР-структурах.

^вОПК — количество *n* и средние длины *<d>* общих парных контактов РСА- и ЯМР-структур.

^гИПК — количество *n* и доля в % среди ОПК идентичных парных контактов и их средняя длина *<d>* в РСА и ЯМР структурах.

^дВПК — количество *n* и средняя длина *<d>* вариабельных парных контактов.

^еПРОСЧЕК — программа, использованная для анализа распределений ϕ , ψ -углов РСА- и ЯМР-структур по карте Рамачандрана.

Таблица 2. PCA- и “растворные” ЯМР-структуры глобулярных белков

Параметры	Структура	Значения ^и	КМ	УБ	Нб	ЛЗК
2-nd ^а	РСА	-0.0 ± 1.8	-0.114	-1.663	-1.1	-0.7
	ЯМР	-3.5 ± 1.9	0.282	0.052	-2.621	-1.669
RAM ^б	РСА	0.3 ± 0.9	-1.135	0.997	-0.6	-0.8
	ЯМР	-4.6 ± 1.6	-3.483	2.198	-7.247	-4.965
b.b. ^в	РСА	0.1 ± 0.1	0.528	2.345	-0.3	-0.3
	ЯМР	-4.0 ± 3.0	-0.593	2.660	-1.624	-2.258
$\chi^1\chi^2$ ^г	РСА	0.4 ± 0.9	-0.760	-1.462	-1.5	-0.1
	ЯМР	-3.7 ± 1.5	-4.191	0.730	-6.707	-6.762
$n/100$ ^д	РСА	7.3 ± 5.8	2.2	5.3	0.7	3.9
	ЯМР	73 ± 63	4.3	14.3	100	31
ЯЭО ^е	ЯМР	10.5 ± 4.2	11.8	35.9	16.4	12.6
RMSD ^ж , Å	ЯМР		0.90	0.45	1.45	1.49
Регулярные структуры ^з , %	РСА		78	72	86	64
	ЯМР		61	71	76	48

Примечание. “2-nd”, “RAM”, “b.b.”, “ $\chi^1\chi^2$ ”, “ $n/100$ ” – параметры программы WHAT IF.

^а – 2-nd generation packing quality – оценивает количество коротких контактов и локальной недоупаковки слишком длинных межатомных контактов у атомов остова и боковых групп.

^б – Характер распределения атомов остова остатков по карте Рамачандрана.

^в – Сравнение конформации остова с PCA-структурами, базирующееся на положениях C_α -атомов остова пяти последовательных остатков и показывающее, на сколько часто остатки с такой конформацией остова около центрального C_α -атома присутствуют у хорошо решенных PCA-структур.

^г – Степень отклонения ротамерных конформаций боковых групп остатков от наиболее предпочтительных для хорошо решенных PCA-структур.

^д – Количество коротких “плохих” парных контактов в расчете на 100 остатков структуры.

^е – Количество ядерных эффектов Оверхаузера в расчете на остаток у ЯМР-структуры. ЯМР-структуры УБ и ЛЗК решались с включением дополнительно к ЯЭО не приведенных в таблице дипольных ограничений: соответственно 4.9 и 1.6 на остаток [22, 23].

^ж – Среднеквадратичное отклонение атомов остова ЯМР-структуры от приведенной в табл. 1 PCA-структуры.

^з – Суммарное содержание регулярной структуры, фиксируемое программой PROCHECK как β -е, E, B, α -h, H, 3_{10} -g, G.

^и – Приведены средние значения для 489 PCA-структур [20] и 545 ЯМР-структур [16], кроме ЯЭО, где даны средние значения для 97 ЯМР структур [21].

Степень зависимости полноты наблюдаемых экспериментально дистанционных ограничений ЯЭО от длины межостаточных контактов проанализирована для набора из 97 ЯМР-структур, взятых из базы PDB. Полнота определена как отношение количества экспериментально наблюдаемых ЯЭО к количеству “ожидаемых” ЯЭО, которое основано на межпротонных расстояниях до обозначенного дистанционного предела в решенных ЯМР-структурах. В наборе из 97 структур эти величины составили 68, 48 и 26% на расстояниях до 3, 4 и 5 Å соответственно, а для пяти лучше определенных структур увеличились до 90, 75 и 45% [26]. Для этих же 97 ЯМР-структур среднее количество экспериментальных ЯЭО составило 10.5 ± 4.2 – как и для ЯМР-структур КМ, Нб и ЛЗК – и в 3 раза меньше, чем для УБ (табл. 2) [21].

По совокупности всех приведенных выше данных три рассмотренных ЯМР-структуры: КМ, Нб

и ЛЗК – соответствуют характерным средним, полученным для очень большого количества белков, ЯМР-структурам, как, возможно, и набору из 60/61 пар ЯМР/РСА-структур [9, 10]. Из большинства этих структур заметно выделяется структура УБ: по лучшему качеству ее решения и большим сходством ЯМР-структуры с PCA-структурой. Это стало возможным благодаря значительному увеличению экспериментальной дистанционной информации ЯЭО и привлечению дополнительных остаточных дипольных ограничений с регистрацией спектров ЯМР, в бицеллах при 304 К подобный результат был достигнут ранее при повторном исследовании ЯМР-структуры ЛЗК [22, 23]. Сравнение ЯМР-информации, полученной для УБ, с таковой для трех других белков позволило предположить, что основной причиной увеличения различий между PCA- и ЯМР-структурами может быть недостаток дистанционных ограничений

ЯЭО, контролирующих направление и амплитуды изменений ЯМР-структур при их уточнении на заключительной стадии энергетической минимизации. Проводимый далее детальный анализ позволяет предполагать, что это распространяется и на 60 пар ЯМР/РСА-структур.

Анализ межостаточных контактов: подразделение на группы

Один из подходов к выяснению возможных различий между РСА- и “растворными” ЯМР-структурами белков, а также причин, их обуславливающих, состоит в сравнении количества и длины межостаточных контактов различных типов. Уже отмеченное в разделе “Введение” основное отличие использованного нами метода совместного анализа контактов в РСА- и ЯМР-структурах состоит в сравнении ПК, образуемых в обеих структурах белка одинаковыми или разными остатками, а не общего количества межостаточных контактов в различных областях молекулы белка и у атомов разных групп остатков. Это позволило выделить наибольшую, 83–94%, группу ОПК, образуемых в паре структур одними и теми же остатками, и более длинных – в среднем на 0.33 Å – собственных ПК, т.е. СПК ЯМР-структур и СПК РСА-структур (табл. 1). Для приведенных в табл. 1 четырех пар структур суммарное количество проанализированных ПК РСА-структур составило 1602 со средней длиной $\langle d \rangle = 3.32 \pm 0.03$ Å, что на 7% больше, чем для 1495 ПК ЯМР структур со средним значением $\langle d \rangle = 3.22 \pm 0.07$ Å, и вкладом СПК соответственно 14% ($\langle d \rangle = 3.56 \pm 0.10$ Å) и 7% ($\langle d \rangle = 3.53 \pm 0.10$ Å). У 1388 ОПК в РСА-структурах значение $\langle d \rangle$ составило 3.28 ± 0.03 Å, а в ЯМР-структурах 3.22 ± 0.07 Å, что на 0.06 Å меньше.

ОПК анализировали двумя способами. В первом их распределяли по двум основным группам: ИПК с одинаковыми контактирующими атомами в РСА- и ЯМР-структурах и ВПК с отличающимися контактирующими атомами пары остатков. Во втором случае ОПК распределяли по группам на основании взаимного расположения контактирующих остатков в структуре: локальные и дальние ОПК – и по положению атомов в паре остатков: между атомами остова, остова и боковых групп и только боковых групп.

Собственные контакты РСА- и ЯМР-структур

При сопоставлении больших групп РСА- и ЯМР-структур общее количество прямых не перекрывающихся межостаточных контактов с расстоянием менее 4–4.5 Å оказалось несколько меньше у ЯМР-структур [9, 13, 24]. У четырех пар ЯМР- и РСА-структур α -спирального Нб и α/β -структурных КМ, УБ и ЛЗК количество ме-

жостаточных контактов с расстоянием ≤ 4.0 Å также на 5–8% и в среднем на ~6% меньше у ЯМР-структур, что соответствует средним значениям при анализе большого набора ЯМР/РСА-структур (табл. 1) [12]. Судя по форме дистанционной зависимости разности плотности контактов в 60 парах ЯМР/РСА-структур в интервале ≤ 4.0 Å, общая плотность всех контактов, контактов полуспрятанных остатков и, в меньшей степени, внутренних остатков ниже для ЯМР-структур [9]. Проведенное нами деление ПК на ОПК и СПК показало, что такие различия между ЯМР- и РСА-структурами возникают из-за различий в количестве более длинных СПК; как уже отмечалось, СПК с общим интервалом $\langle d \rangle$ от 3.49 до 3.71 Å для четырех ЯМР/РСА-структур в среднем длиннее ОПК на 0.33 Å (табл. 1).

При близких средних расстояниях СПК в ЯМР- и РСА-структурах их количество меньше у всех исследованных нами четырех ЯМР-структур – в среднем почти в 2 раза, – что и проявляется в уменьшении на ~7% общего количества межостаточных контактов с расстоянием ≤ 4.0 Å (табл. 1). К такому уменьшению приводит уже упомянутое уменьшение вероятности обнаружения в спектрах ЯМР прямых межостаточных контактов с увеличением расстояния из-за уменьшения интенсивности ЯЭО с увеличением межпротонных расстояний от ≤ 3 до ≤ 5 Å [26]. Количество таких контактов увеличивается при уточнении ЯМР-структур в окружении молекул воды [13, 24]. На дистанционной зависимости разности плотности контактов 100 ЯМР структур набора DRESS такое увеличение проявляется в присутствии минимумов в интервале ≤ 4.0 Å [9].

На разности плотности контактов в ЯМР- и РСА-структурах белков максимумы и минимумы появляются за счет различий в количестве контактов и их длине. Как уже отмечалось, в парах ЯМР/РСА-структур УБ, Нб, ЛЗК и КМ количество СПК в РСА структурах в 1.8–2.3 раза (в среднем в 2.1 раза) больше, чем СПК в ЯМР-структурах (табл. 1). Разница в значениях $\langle d \rangle$ этих же СПК ЯМР-и РСА-структур составляет от 0 до не более 0.08 Å, поэтому при построении разности в плотности всех СПК ЯМР- и РСА-структур для каждой из четырех пар появятся только минимумы. Значения $\langle d \rangle$ этих четырех минимумов находятся в интервале 3.51–3.7 Å – с наименьшей величиной для α -спирального Нб и наибольшей для преимущественно содержащего β -структуры УБ. Таким образом, при построении общей для четырех пар структур дистанционной зависимости разности плотности контактов ЯМР/РСА-структур с интервалом усреднения 0.5 Å, как и для 60 пар структур, за счет СПК появится только общий широкий минимум с $\langle d \rangle = 3.75$ Å и поверхностью, составляющей 5–6% от всех ПК каждого из четырех белков. Наличие СПК-обусловленного

минимума увеличивает поверхность минимума, который образуется при расчетах разности плотности ОПК ЯМР- и РСА-структур этих белков. Широкий минимум с таким же значением d (3.75 Å) для всех контактов всех остатков присутствует на дистанционной зависимости разности плотности контактов 60 пар ЯМР/РСА-структур белков [9].

Общие парные контакты

Сравнительный анализ межостаточных контактов в кристаллических РСА-структурах и ЯМР-структурах белков проводили для ОПК, образуемых в обеих структурах одной и той же парой остатков. Эти ОПК составляют 83–94% от всех наиболее коротких 4 Å ПК, локализуемых в этих структурах программой PROCHECK (табл. 1). Только таким образом проведенный анализ межостаточных контактов позволил охарактеризовать степень различий между РСА- и ЯМР-структурами в долях всех ОПК, длина которых не изменилась в ЯМР-структуре ($\Delta d = 0$) и долях ИПК, в которых не изменились контактирующие атомы в ЯМР-структуре (табл. в тексте). По этим двум параметрам лидирует структура УБ, у нее же наименьшее значение величины RMSD атомов остова ЯМР-структуры по сравнению с РСА-структурой [22, 23, 28, 29]. По величине RMSD за ней следует КМ и у нее доля ОПК с неизменной длиной больше, чем у остальных двух структур: ЛЗК и Нб. Различия между структурами ЛЗК и Нб в величинах всех трех параметров: Δd , ИПК и RMSD — невелики и не носят системного характера.

	$\Delta d = 0, \%$	ИПК, %	RMSD, Å
УБ	28	82	0.45
КМ	22	68	0.90
ЛЗК	13	63	1.49
Нб	11	68	1.45

При последующем более детальном анализе подразделение всех ОПК для РСА- и ЯМР-структур проводили двумя способами. Один из них — выделение двух основных групп: уже упомянутой, наибольшей, ИПК с одинаковыми контактирующими атомами в РСА- и ЯМР-структурах и имеющими большую длину ВПК с разными атомами контактирующих остатков. В среднем, в четырех парах РСА/ЯМР-структур величина $\langle d \rangle$ составляла 3.22 ± 0.04 Å и 3.20 ± 0.06 Å для ИПК и 3.37 ± 0.08 Å и 3.30 ± 0.12 Å для ВПК. Среди четырех пар структур наибольшая доля ИПК получена для УБ (82%), у трех других пар структур эта величина соответствует 63–68% (табл. 1). Наибольшее различие по значениям $\langle d \rangle$ для ОПК, ИПК и ВПК между РСА- и ЯМР-структурами получено в случае Нб: они на 0.15, 0.10 и 0.22 Å меньше в его ЯМР-структуре. В трех остальных парах структур

максимальное уменьшение $\langle d \rangle$ составляет соответственно 0.05, 0.04 и 0.10 Å. Во всех четырех парах наибольшее различие наблюдается в значениях $\langle d \rangle$ для ВПК, которые, в свою очередь, можно подразделить еще на две группы ПК (см. далее).

При другом способе анализа все ОПК тоже подразделяли на две основные группы: локальные ОПК между остатками в положениях $|i - j| \leq 4$ (ближние и средние контакты) и дальние ОПК между остатками в положениях $|i - j| \geq 5$. В среднем, во всех парах структур преобладают локальные ОПК (80%) со значениями $\langle d \rangle$, соответствующими 3.22 ± 0.03 Å и 3.19 ± 0.05 Å в РСА- и ЯМР-структурах, а для дальних ОПК (их 20%) значения $\langle d \rangle$ больше и составляют 3.47 ± 0.10 Å и 3.36 ± 0.07 Å. Наибольшая доля локальных ОПК (85%) в плотно скрученной полипептидной цепи α -спирального Нб, а наименьшая (65%) — в УБ, с вытянутой полипептидной цепью, в которой преобладает β -структура (табл. 3). Как и при распределении ОПК РСА/ЯМР структур на ИПК и ВПК, разница между РСА- и ЯМР-структурами по значениям $\langle d \rangle$ наибольшая для Нб: для локальных и дальних ОПК ЯМР-структуры уменьшение относительно РСА-структуры соответствует 0.10 и 0.35 Å; для остальных трех пар структур эти различия соответственно не превышают 0.03 и 0.11 Å.

В парах РСА/ЯМР-структур наряду с группами ПК: ИПК/ВПК и локальные/дальние ОПК — величины $\langle d \rangle$ сравнивали для таких ПК, как остов-остов, остов-боковая группа и боковая группа-боковая группа. Однако при проведении сравнительного анализа необходимо учитывать, что среди ВПК присутствуют контакты двух типов: несмешанные ВПК с отличиями в контактирующих атомах при сохранении приведенных трех типов контактов и смешанные ВПК с изменением типа контакта, как например, остов-остов на остов-боковая группа или боковая группа-боковая группа. При расчетах количеств и значений $\langle d \rangle$ ПК трех типов такие смешанные ВПК с изменением их типа в ЯМР-структурах были исключены, поэтому суммарное количество ПК этих трех типов оказалось меньше количества ОПК. Такие изменения типа ПК, естественно, не влияли на их включение в группы локальных и дальних ОПК.

В четырех парах РСА- и ЯМР-структур среди контактов всех трех типов преобладают контакты остов-остов — в среднем 65% от всех ОПК, — они короче остальных ($\langle d \rangle = 3.21$ и 3.20 Å) с практически одинаковой средней длиной в парах (уменьшение $\langle d \rangle$ для ЯМР структур составляло всего 0.01 Å). Количество контактов остов-боковая группа меньше в 4 раза (16%), они длиннее на 0.18–0.20 Å с $\langle d \rangle = 3.41$ и 3.38 Å и уменьшением $\langle d \rangle$ на 0.03 Å в ЯМР-структурах. Еще меньше число контактов боковая группа-боковая группа (в среднем 6%), они еще длиннее ($\langle d \rangle = 3.64$ и 3.52 Å) и значения

Таблица 3. Средние длины (Å) общих межостаточных парных контактов и их двух компонент в ЯМР- и РСА-структурах убиквитина и мономерного гемоглобина и одной преобладающей компоненты всех межостаточных парных контактов в 60 парах ЯМР-и РСА-структур

	Все		Локальные		Дальние		Остов–остов		Остов–боковая группа		Боковая группа–боковая группа	
	$\langle d \rangle$	$\Delta\langle d \rangle$	$\langle d \rangle$	$\Delta\langle d \rangle$	$\langle d \rangle$	$\Delta\langle d \rangle$	$\langle d \rangle$	$\Delta\langle d \rangle$	$\langle d \rangle$	$\Delta\langle d \rangle$	$\langle d \rangle$	$\Delta\langle d \rangle$
УБ	<i>n</i> , %	236 (100)	154 (65)		82 (35)		165 (70)		37 (16)		24 (10)	
ЯМР	РСА	3.30	3.24	3.26	3.42	3.37	3.24	3.24	3.42	3.39	3.55	3.59
ЯМР	ЯМР	3.19 ⁺	3.18 ⁺	3.36	3.22 ⁺	3.57	3.16 ⁺	3.37	3.25 ⁺	3.65	3.32 ⁺	3.65
РСА	РСА	3.39 ⁻	3.34 ⁻	3.23	3.54 ⁻	3.28	3.32 ⁻	3.19	3.40 ⁻	3.38	3.75 ⁻	3.29
	%	↓38	↓42	↑26	↓33	↑52	↓33	↑34	↓46	↑41	↓42	↑42
		↑34	=28	=32	=15	=15	=33	=13	=16			
Нб	<i>n</i> , %	566 (100)	479 (85)		87 (15)		385 (68)		46 (8)		40 (7)	
ЯМР	РСА	3.13	3.12	3.22	3.26	3.61	3.13	3.22	3.15	3.38	3.26	3.66
ЯМР	ЯМР	2.95 ⁺	2.89 ⁺	3.43	3.19 ⁺	3.51	2.91 ⁺	3.44	2.97 ⁺	3.52	3.23 ⁺	3.40
РСА	РСА	3.35 ⁻	3.26 ⁻	3.14	3.70 ⁻	3.28	3.25 ⁻	3.15	3.44 ⁻	3.26	3.74 ⁻	3.15
	%	↓58	↓46	↑30	↓79	↑14	↓53	↑34	↓67	↑24	↓88	↑10
		↑31	=11	=24	=7	=7	=13	=9	=2			
60 структур	ЯМР	2.75 ⁺	2.75 ⁺	3.25 ⁺	3.25 ⁺		2.75 ⁺		3.25 ⁺		3.25 ⁺	
	РСА	3.25 ⁻	3.25 ⁻	3.75 ⁻	3.75 ⁻		3.25 ⁻		3.75 ⁻		4.25 ⁻	

Примечание. ↓, ↑, = – относительные размеры (в %) групп ОПК, средняя длина которых уменьшилась (↓), увеличилась (↑) и не изменилась (=) в ЯМР-структуре относительно РСА-структуры.
 “+”, “-” – обозначены средние длины соответственно в ЯМР- и РСА-структуре компоненты ОПК УБ и Нб и всех ПК 60 белков с уменьшением средней длины в ЯМР-структуре [9].

$\langle d \rangle$ для них в ЯМР структурах снижены уже на 0.12 Å. Эта группа ПК характеризуется наибольшим значением $\langle d \rangle$ среди всех групп ОПК и такими же большими, как и у СПК значениями $\langle d \rangle$ (3.61 и 3.56 Å) с превышением на 0.33–0.34 Å значений (3.28 и 3.22 Å) для ОПК всех четырех пар структур

В качестве общей закономерности сравниваемых пар ОПК РСА- и ЯМР-структур можно отметить уменьшение разницы в значениях $\langle d \rangle$ между группами ОПК в ЯМР-структурах. В РСА-структурах различия в значениях $\langle d \rangle$ между ИПК и ВПК составляли 0.15 ± 0.05 Å и сокращены до 0.10 ± 0.06 Å в ЯМР-структурах, между локальными и дальними группами ОПК разница уменьшилась от 0.25 Å в РСА-структуре до 0.17 Å в ЯМР-структуре. Эти сокращения длин стали результатом более сильного уменьшения в ЯМР-структурах величины $\langle d \rangle$ для групп более длинных ПК; так, значения $\langle d \rangle$ более коротких ИПК и локальных ОПК уменьшаются на 0.02–0.03 Å, длинных ВПК – на 0.07 Å, а еще более длинных, дальних ОПК, – на 0.11 Å. Таким образом, значения $\langle d \rangle$ для всех ОПК уменьшились на 0.05 Å, ПК – на 0.06 Å и СПК – на 0.07 Å.

Длины межостаточных контактов в ЯМР- и РСА-структурах

Сравнительный анализ межостаточных контактов в четырех парах ЯМР/РСА-структур позволил выявить важную особенность ЯМР-структуры – присутствие в ней в большом и соизмеримом количестве групп ОПК с уменьшением и увеличением их длины относительно РСА-структуры, так и группы с отсутствием таких изменений. В табл. 3 это проиллюстрировано на примере пар ЯМР/РСА-структур для УБ, с наименьшими, и для Нб, с наибольшими, изменениями длин групп ОПК в ЯМР структуре. Характер изменения средней длины $\langle d \rangle$ ОПК ЯМР-структуры и ее различных фрагментов определяется соотношением величин этих групп ПК, значение $\langle d \rangle$ остается таким же, уменьшается или увеличивается с изменением этого соотношения. Такая внутримолекулярная гетерогенность не могла быть обнаружена при сравнении дистанционной зависимости плотности межостаточных контактов в 60/61 парах ЯМР/РСА структур [9, 10]. Это сравнение было основано на усреднении количества контактов с интервалом длины в 0.5 Å, начиная с 2 Å. На диаграмме разности плотности всех контактов между ЯМР-структурами и РСА-структурами первый максимум, при 2.75^+ Å, находится в интервале 2.5–3.0 Å и соответствует большому количеству всех контактов в ЯМР-структуре; а первый минимум, при 3.25^- Å, – в интервале 3.0–3.5 Å и соответствует большому количеству всех контактов в РСА-структуре. В паре структур Нб этим максимумам и минимумам по своему положению

соответствуют величины $\langle d \rangle$ первой преобладающей группы из 58% ОПК с $\langle d \rangle$ при 2.95^+ Å в ЯМР структуре и увеличенной $\langle d \rangle$ до 3.35^- Å в РСА структуре. У следующей по величине второй группы из 31% ОПК Нб значение $\langle d \rangle$ составляло 3.43 Å в ЯМР-структуре и снижено до 3.15 Å в РСА-структуре; для остальных 11% ОПК третьей группы значения $\langle d \rangle$ не отличались в ЯМР- и РСА-структурах. (Величинами в Å с “+” и “-” обозначены длины одной из трех групп ОПК с преобладающими размерами, в %, соответственно в ЯМР- и РСА-структурах). Присутствие этих трех групп ОПК влияет на амплитуды максимумов и минимумов на дистанционной зависимости разности плотности межостаточных контактов в ЯМР- и РСА-структурах. При определении такой разности для 60/61 пар структур рассчитывали плотность контактов групп остатков с различной степенью погружения в структуру [9, 10]. С контактами поверхностных и внутренних остатков в этих структурах по различиям в длине сопоставимы локальные и дальние ОПК в четырех парах исследованных нами ЯМР/РСА-структур, поскольку локальные короче дальних, как и внешние короче внутренних.

С результатами сравнительных исследований плотности групп межостаточных контактов в 60/61 парах ЯМР/РСА-структур лучше всего согласуются данные о величинах $\langle d \rangle$ групп ОПК для Нб – благодаря значительному преобладанию ОПК с уменьшением $\langle d \rangle$ в ЯМР-структуре, в среднем почти в два раза (58%), над ОПК с увеличением $\langle d \rangle$ (31%) и наибольшему значению уменьшения $\langle d \rangle$ на 0.4 Å (табл. 3 и табл. 4). У трех других пар структур уменьшение $\langle d \rangle$ составляло 0.2–0.3 Å с наименьшей величиной у пары структур УБ. Основное характерное для ЯМР-структур отличие набора из 60 пар структур и пары Нб от трех других исследованных нами пар структур состоит в укорочении расстояний межостаточных контактов. Так, в 0.5 Å интервал с $\langle d \rangle$ короче 3.0 Å попадают максимумы распределений плотностей всех контактов: и внешних контактов 60 ЯМР структур, и величины $\langle d \rangle^+$ преобладающих групп всех межостаточных контактов, в том числе и локальных ОПК ЯМР-структуры Нб (табл. 3 и табл. 4). В ЯМР-структурах КМ, ЛЗК, УБ соответствующие значения $\langle d \rangle^+$ находятся в интервале 3.00–3.19 Å.

Среди всех ОПК четырех пар структур преобладают локальные ОПК с относительным вкладом от 65% (для УБ) до 85% (для Нб) (табл. 3). Таким образом, различия в значениях величин $\langle d \rangle$ для их ЯМР- и РСА-структур в значительной степени определяют и различия в величинах $\langle d \rangle$ всех ОПК. Разница между ЯМР- и РСА-структурами в значениях $\langle d \rangle^+$ и $\langle d \rangle^-$ преобладающих групп всех, в том числе и локальных ОПК, оказалась наибольшей у Нб (0.37–0.40 Å); для трех других пар

Таблица 4. Средние длины (Å) преобладающих групп общих межостаточных парных контактов в ЯМР-структурах (d^+) и РСА-структурах (d^-) четырех белков и всех межостаточных парных контактов в 60 парах ЯМР/РСА-структур

Белок	Все			Локальные			Дальние			Остов—остов			Остов—боковая группа			Боковая группа—боковая группа		
	$\langle d \rangle^+$	$\langle d \rangle^-$	$-\langle \Delta d \rangle$	$\langle d \rangle^+$	$\langle d \rangle^-$	$-\langle \Delta d \rangle$	$\langle d \rangle^+$	$\langle d \rangle^-$	$-\langle \Delta d \rangle$	$\langle d \rangle^+$	$\langle d \rangle^-$	$-\langle \Delta d \rangle$	$\langle d \rangle^+$	$\langle d \rangle^-$	$-\langle \Delta d \rangle$	$\langle d \rangle^+$	$\langle d \rangle^-$	$-\langle \Delta d \rangle$
УБ	3.19	3.39	0.20	3.18	3.34	0.16	3.57	3.28	-0.29	3.16	3.32	0.16	3.25	3.40	0.15	3.32	3.75	0.43
ЛЗК	3.06	3.36	0.30	3.00	3.27	0.27	3.21	3.64	0.43	2.96	3.27	0.31	3.20	3.50	0.30	3.28	3.67	0.39
КМ	3.11	3.38	0.27	3.04	3.30	0.26	3.25	3.55	0.30	3.02	3.25	0.23	3.24	3.62	0.38	3.57	3.77	0.20
Нб	2.95	3.35	0.40	2.89	3.26	0.37	3.19	3.70	0.51	2.91	3.25	0.34	2.97	3.44	0.47	3.23	3.74	0.51
60 структур	2.75	3.25	0.50	2.75	3.25	0.50	3.25	3.75	0.50	2.75	3.25	0.50	3.25	3.75	0.50	3.25	4.25	1.00

структур эти значения попадали в интервал 0.16–0.30 Å (табл. 4). Эти различия между парами структур возникают только за счет обсуждаемых здесь различий между ЯМР-структурами – величины $\langle d \rangle^-$ преобладающих групп всех, в том числе и локальных, ОПК всех четырех РСА-структур находятся в общем 0.5 Å интервале 3.0–3.5 Å, как и максимум плотности контактов 3.25⁻ Å для 60/61 РСА-структур.

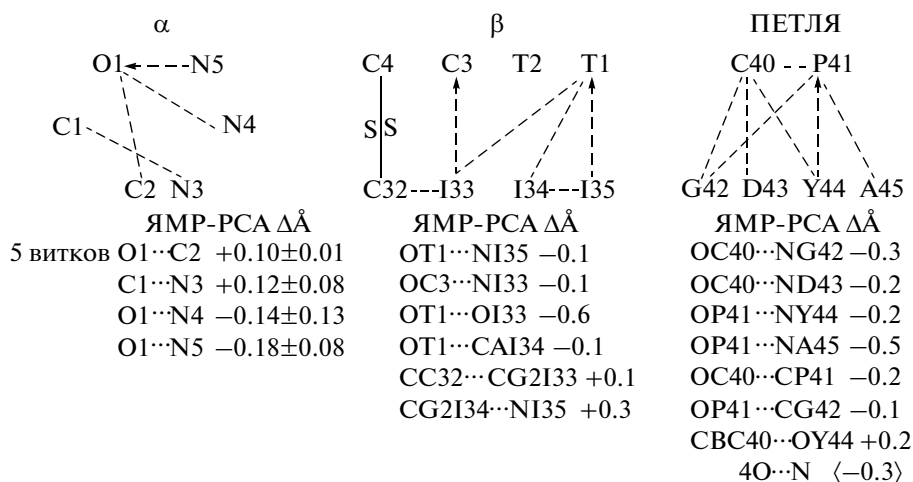
В группе дальних ОПК для исследованных нами пар структур и внутренних контактов 60 пар структур несколько выделяется УБ: здесь преобладает (52%) вторая группа ОПК с увеличением $\langle d \rangle$ в ЯМР-структуре и смещением в интервал 3.5–4.0 Å, где находятся преобладающие группы ОПК трех других РСА-структур и максимум плотности контактов 60 РСА-структур (табл. 3 и табл. 4). Как в случае всех, в том числе и локальных контактов, в общем интервале 3.0–3.5 Å присутствуют некоторые из величин d^+ и d^- преобладающих групп ОПК соответственно ЯМР- и РСА-структур. Это величины d^- групп ОПК между атомами остова РСА-структур четырех пар и распределений плотностей всех контактов между атомами остова РСА-структур 60/61 пар вместе с величинами $\langle d \rangle^+$ контактов между атомами остова двух ЯМР-структур УБ и КМ. В интервал более коротких межостаточных контактов (2.5–3.0 Å) типа остов—остов с более сильным (на 0.31–0.50 Å) уменьшением их длины вместе с ЯМР-структурами набора 60/61 структур и Нб попадает и ЯМР-структура ЛЗК со значением $\langle d \rangle^+$, равным 2.96 Å. Относительно величин $\langle d \rangle^-$ в РСА-структуре в ЯМР-структуре величины $\langle d \rangle^+$ контактов остов—остов уменьшены для ЛЗК и Нб на 0.31–0.34 Å, а для УБ и КМ на 0.16–0.23 Å (табл. 4).

Еще одно отличие пары структур Нб от трех других и 60 пар структур замечено в группе контактов остов—боковая группа. Как в ЯМР-, так и РСА-структуре Нб максимум (2.97⁺ Å) и минимум

(3.44⁻ Å) преобладающей группы ОПК смещены в соседние 0.5 Å интервалы более коротких контактов относительно более длинных контактов в 60 парах структур с максимумом при 3.25⁺ Å в ЯМР-структурах и минимумом при 3.75⁻ Å в РСА-структурах (табл. 4). Присутствие такого же смещения в РСА-структуре Нб предполагает, что оно обусловлено сохраняющейся и в ЯМР-структуре спецификой этой преобладающей группы ОПК нативной структуры Нб и их заметно меньшей длиной, чем в среднем у 60 пар структур и в ЯМР-структурах УБ, ЛЗК и КМ.

В группе наиболее длинных контактов между атомами боковых групп у 60 пар структур минимум при 4.25⁻ Å выходит за пределы анализируемого нами интервала ≤ 4.0 Å. Но на распределении для 60 пар структур на этом минимуме присутствует хорошо выраженный перегиб при 3.75 Å – там же, где присутствуют и более протяженные (3.67–3.77 Å) минимумы преобладающей группы ОПК в Нб, КМ, ЛЗК и УБ (табл. 4), которые, очевидно, могут превратиться в такие же перегибы на 4.0–4.5 Å минимумах при увеличении интервала определяемых преобладающих групп ОПК между атомами боковых групп до 4.5 Å.

Сравнительный анализ средней нормализованной плотности упаковки различных ЯМР-структур и различных кристаллических упаковок одного и того же белка показал, что для 70 белков различия между ними могут быть очень велики; при этом для ЯМР-структур разных белков они находятся в заметно более широком интервале, чем для РСА-структур. Предполагается, что основная причина этих различий – недостаточно высокое качество рассмотренных ЯМР-структур – их “разрешение” в сравнении с таковым для РСА-структур [30]. Различные подходы использованы для независимой оценки качества 35 из 60 ЯМР-структур; в результате показано, что почти для половины оно оказалось невысоким [11]. Что касается 60 пар структур, можно предположить, что



Изменение длины различных общих контактов в ЯМР-структуре крамбина относительно РСА-структуры, решенной с разрешением 1.5 Å [ICRN] (← водородные связи).

α – 5 витков – разница в средних длинах четырех пар контактов пяти витков α-спиралей; β – разница в длинах контактов двух нитей β-листа; петля – разница в длинах контактов внутри дипептида и между дипептидом и тетрапептидом С-концевой части петли 36–46.

различия в качестве их решения будут сокращаться, но не исчезнут вообще. С этой точки зрения набор из 60 пар структур можно рассматривать как характерный для сравниваемых пар ЯМР/РСА-структур; соответственно характерной может быть и описанная для этого набора структур дистанционная зависимость разности плотности межостаточных контактов для ЯМР- и РСА-структур с уменьшением их длины в ЯМР-структурах.

Предполагается, что наблюдаемые различия в межостаточных контактах между РСА- и ЯМР-структурами индивидуальных пар белков возникают, главным образом, из-за различий в способах математической обработки экспериментальных результатов [9]. Сюда же можно отнести и методы, использованные при решении этих 60 ЯМР-структур. При их дополнительном уточнении по программе TASSER для 48 структур уменьшилось отклонение от РСА-структур: в среднем на ~0.3 Å снизились значения RMSD атомов ЯМР-структур относительно РСА [31]; соответственно уменьшились бы и обсуждаемые различия в дистанционной зависимости разности плотности контактов ЯМР- и РСА-структур. Однако уточнения структур по различным программам могут приводить к противоположным результатам. Так, при уточнении ЯМР-структуры УБ [1DZR] по программе TASSER RMSD значения C_{α} атомов остова в РСА-структуре уменьшились от 0.970 до 0.909 Å, а по программе RECOORD увеличились до 1.241 Å [16, 31].

Далее рассмотрены две возможные причины различий между ЯМР- и РСА-структурами, причем относятся они к формированию ЯМР-структур. Одна из них связана с окончательным уточ-

нением ЯМР-структур с применением метода энергетической минимизации – с неизбежным антискоррелированным предпочтительным сокращением длины более сильных внутримолекулярных контактов и одновременным увеличением длины некоторого количества более слабых взаимодействий, – как это рассмотрено на примере КМ, с его α- и β-структурами (рисунок). Другая причина относится к ЯМР-структурам Нь, ЛЗК, УБ, решенным по программе X-PLOR – с ее уменьшенными ван-дер-ваальсовыми радиусами атомов относительно стандартных величин. Это позволяет сильнее сблизить атомы на стадии формирования ЯМР-структур с использованием расчетов траекторий имитации молекулярной динамики и на стадии их заключительной энергетической минимизации. К двум другим наиболее общим и очевидным причинам различий между РСА- и ЯМР-структурами относится заметно меньшее количество экспериментальной информации при решении большинства ЯМР-структур и локальная деформация средней “растворной” структуры белков под влиянием межмолекулярных контактов кристаллической упаковки.

Энергетическая минимизация ЯМР-структур

На завершающих стадиях решения “растворную” ЯМР-структуру КМ, как и в случае других белков, подвергали многошаговым ограничиваемым имитациям траекторий молекулярной динамики с последующими энергетическими минимизациями образовавшихся структур в вакуумном окружении [32]. Предпочтительное сокращение при энергетической минимизации длины более сильных контактов наглядно проявляется в ло-

Таблица 5. Средние длины ($\langle d \rangle$) и энергии ($\langle E \rangle$) всех общих межпептидных водородных связей и α -спиральных сегментов в ЯМР- и РСА-структурах

Белок	Число Н-связей	$\langle d \rangle$, Å		$\Delta \langle d \rangle$, Å	$-\langle E \rangle$, ккал/моль		$\Delta \langle E \rangle$, ккал/моль
		ЯМР	РСА		ЯМР	РСА	
КМ	20	2.82 ± 0.13	2.95 ± 0.13	-0.13	2.50 ± 0.73	2.20 ± 0.45	-0.30
КМ	15 α	2.84 ± 0.12	2.97 ± 0.14	-0.13	2.52 ± 0.78	2.16 ± 0.44	-0.36
УБ	33	2.94 ± 0.19	2.94 ± 0.19	0.00	2.26 ± 0.69	2.24 ± 0.62	-0.02
УБ	10 α	2.92 ± 0.12	2.94 ± 0.12	-0.02	2.24 ± 0.51	2.22 ± 0.38	-0.02
ЛЗК	18 α	2.92 ± 0.27	3.00 ± 0.16	-0.08	2.48 ± 1.04	2.34 ± 0.44	-0.14
ЛЗК	12 α	3.09 ± 0.32	3.02 ± 0.19	0.07	1.47 ± 0.79	1.93 ± 0.53	0.46
Нб	53 α	3.17 ± 0.42	3.06 ± 0.19	0.11	1.83 ± 0.93	1.99 ± 0.46	0.16

кальных антискоррелированных изменениях конформации жестких α -спиралей КМ (рисунок). Относительно 1.5 Å РСА-структуры в ЯМР-структуре средняя длина 15 α -спиральных водородных связей уменьшается на 0.13 Å, и энергия (E) таких связей снижается в среднем на 0.36 ккал/моль (табл. 5). В 5 витках α -спиралей ЯМР-структуры небольшое сокращение длины двух контактов: O1–N4 и O1–N5 – спирального витка антискоррелировано с еще меньшим увеличением длины двух других: O1–C2 и C1–N3. Такое согласованное изменение длины – неизбежное следствие очень плотной межатомной упаковки сильно скрученной жесткой спиральной геометрии. Антискоррелированность изменений слабее проявляется в более гибкой петлевой конформации сегмента C40–A45. Здесь заметно в среднем более сильное, на 0.3 Å, сокращение в ЯМР-структуре длины четырех ИПК O–N между дипептидом и тетрапептидом приводит к их сближению с одновременным уменьшением на 0.1–0.2 Å длины и двух не O–N ИПК между ними и вдоль дипептида. На 0.2 Å увеличивается длина ИПК боковая группа–остов при уменьшении на 29° угла ψ_{44} в ЯМР-структуре. В более жесткой плоскости β -листа взаимосцеплены и также антискоррелированы изменения дальних контактов – между β -нитями – и локальных – вдоль β -нитей (рисунок). Сближение в ЯМР-структуре двух β -нитей при уменьшении на 0.1 Å двух связанных водородными связями ИПК O–N проявляется и в уменьшении на 0.1–0.6 Å двух других ИПК: O–O и O–CA – между β -нитями. Смещение остова I35 и вместе с остовом боковой группы I33 в направлении, перпендикулярном β -нити, к другой β -нити увеличивает на 0.1–0.3 Å контакты с их соседями по β -нити I34 и C32.

Длина 15 α -спиральных водородных связей КМ сократилась в такой же степени на 0.13 Å: от 2.96 до 2.83 Å – при ограниченной энергетической минимизации в вакуумном окружении уточ-

ненной до 0.945 Å этой же РСА-структуры КМ с увеличенными джиргенсоновскими радиусами объединенных C-атомов, сильными электростатическими взаимодействиями при $\epsilon = 1r$, но с некоторыми дистанционными ограничениями на дальнедействующие электростатические взаимодействия [33]. Относительно 1.5 Å РСА-структуры КМ в его “растворной” ЯМР-структуре на такую же величину, 0.13 Å, сократилась величина $\langle d \rangle$ и на 0.30 ккал/моль снизилась средняя энергия $\langle E \rangle$ всех 20 общих межпептидных водородных связей (табл. 5). С 3.27 ± 0.31 до 3.22 ± 0.31 Å уменьшились значения $\langle d \rangle$ всех 152 ОПК (табл. 1). У выделенной преобладающей группы всех ОПК КМ в ЯМР-структуре значения $\langle d \rangle$ уменьшились на 0.27 Å, у 5 таких отдельных групп ОПК уменьшение $\langle d \rangle$ составило 0.20–0.38 Å, оставаясь при этом всегда меньше, чем в ЯМР-структуре Нб (табл. 4). По аналогии с витками α -спирали и β -нитями все эти сокращения длин межостаточных контактов могут быть результатом усиления электростатических взаимодействий в ЯМР-структуре относительно РСА-структуры КМ.

Как и в паре ЯМР/РСА структуры КМ, очень небольшое сокращение длин межостаточных контактов и межпептидных водородных связей наблюдается при попарном сравнении средней плотности контактов и количества водородных связей в ЯМР/РСА структурах 60 глобулярных белков [9]. В области обоих максимумов при 2.5–3.5 Å распределения по длинам межостаточных контактов и межпептидных водородных связей для ЯМР-структур смещены в направлении более коротких межатомных расстояний. По длинам межпептидных водородных связей такое смещение происходит за счет вклада 37 из 60 ЯМР-структур, которые решены не по программе X-PLOR, как и структура КМ [9]. Аналогично структуре КМ, при энергетической минимизации этих структур вместе с длинами межпептидных

водородных связей могут сокращаться длины и других межстаточных контактов с увеличением всей энергии внутримолекулярных взаимодействий.

У решенных по программе X-PLOR остальных 23 ЯМР-структур распределение по длинам межпептидных водородных связей смещено в направлении увеличения длин относительно 37 структур, решенных по другим программам [9]. При решении ЯМР-структур по программе X-PLOR минимизируется только положительный отталкивающий член ван-дер-ваальсовых взаимодействий (с прекращением минимизации при $E = 0$). Его величина уменьшается до 7 ккал/моль у энергетически минимизируемой структуры Hb при общей величине минимизированной энергии X-PLOR 66 ккал/моль (вся энергия Леннарда-Джонсовского потенциала изменилась до -535 ккал/моль по сравнению с -540 ккал/моль до минимизирования) [29]. Относительно PCA-структуры в этой ЯМР-структуре значения $\langle d \rangle$ для 53 межпептидных водородных связей увеличились на 0.11 \AA и величина $\langle E \rangle$ уменьшилась на 0.16 ккал/моль (табл. 5). В то же время значения $\langle d \rangle$ для всех 566 ОПК уменьшилось на 0.15 \AA , а для контактов остова-остова — на 0.09 \AA , т.е. несколько меньше, возможно, из-за вклада межпептидных водородных связей с увеличенной $\langle d \rangle$ в ЯМР-структуре (табл. 3).

В программе X-PLOR отсутствует член, который мог бы энергетически благоприятствовать не увеличению, а сокращению длины межстаточных или межатомных контактов при решении ЯМР-структур по этой программе [29]. Более сильное энергетически (стерически) не затрудняемое сближение атомов ЯМР-структуры происходит из-за уменьшения в программе X-PLOR ван-дер-ваальсовых радиусов атомов в среднем до 0.8 от стандартных величин, используемых в силовом поле CHARMM [25]. При решении ЯМР-структуры Hb такое же сокращение длины радиусов составляло до 0.9 при высокой температуре и до 0.77 при низкой от величин CHARMM [29]. Относительно PCA-структуры в ЯМР-структуре Hb величины $\langle d \rangle$ уменьшились на 5% для всех ОПК и на 3–11% для пяти различных групп ОПК, для преобладающих групп ОПК уменьшение величины $\langle d \rangle$ было сильнее: всех ОПК на 12% и пяти групп ОПК на 10–14% (табл. 3 и табл. 4). Как уже обсуждалось в предыдущем разделе, такие уменьшения длин межстаточных ОПК в ЯМР-структуре Hb относительно PCA-структуры близки к уменьшению этих длин распределений плотностей межстаточных контактов у 60/61 пар ЯМР/PCA структур.

Для ЯМР-структур белков, решенных по программе X-PLOR, следствием уменьшения ван-дер-ваальсовых радиусов атомов становится сильное увеличение количества коротких меж-

атомных контактов, определяемых программой WHAT IF с различными нормальными атомными радиусами [25]. В ЯМР-структуре Hb количество таких коротких контактов в 1.4 раза больше, чем в среднем у 545 ЯМР-структур, и в 3 и 7 раз больше, чем у решенных по этой же программе X-PLOR структур соответственно ЛЗК и УБ (табл. 2). 545 ЯМР-структур белков решены по разным программам с количеством коротких контактов в расчете 73 ± 63 на 100 остатков, которое изменили до 87 ± 37 и 11 ± 9 при перерасчетах и уточнениях этих структур соответственно по программе CYANA с немного сокращенными радиусами атомов (как и у программы X-PLOR) и по программе CNS с нормальными радиусами [16]. Также невелико количество коротких контактов (4.3) в ЯМР-структуре КМ, рассчитанной с нормальными ван-дер-ваальсовыми радиусами по программе GROMOS (табл. 2).

При решении по программе X-PLOR ЯМР-структуры ЛЗК ввели дополнительные дистанционные ограничения на наличие межпептидных водородных связей в сегментах с регулярной α - и β -структурой, о присутствии которых свидетельствовали независимо полученные данные: сильное замедление в растворе скорости H–D обмена в пептидных NH-группах [23]. Для α -спиральных сегментов эти ограничения затронули интервал расстояний N(i)–O(i-4): $2.3\text{--}3.3 \text{ \AA}$. При этих условиях для 18 водородных связей трех α -спиралей ЛЗК в ЯМР-структуре (относительно PCA-структуры) величина $\langle d \rangle$ уменьшилась на 0.08 \AA и $\langle E \rangle$ увеличилась на 0.14 ккал/моль (табл. 5). В отсутствие этих ограничений у 12 других водородных связей α - и 3_{10} -спиралей в ЯМР-структуре $\langle d \rangle$ увеличилось и $\langle E \rangle$ уменьшилось относительно PCA-структуры ЛЗК — как и всех 53 межпептидных водородных связей Hb при решении ЯМР-структуры по программе X-PLOR без каких-либо дополнительных ограничений.

Основным “динамическим” результатом введения дистанционных ограничений стало исключение разрыва внутриспиральных межпептидных водородных связей в ансамбле из 50 наиболее низкоэнергетических моделей ЯМР-структур ЛЗК. В двух из трех α -спиралей, А и В, у 6 из 17 парных контактов межпептидных водородных связей между этой же парой остатков более коротким оказывается второй парный контакт с участием атомов боковых групп. В приведенных ниже пяти из шести водородных связей этот более короткий контакт появился с карбонильным атомом О остова, а не с его партнером по водородной связи — NH-группой остова. В четырех случаях из пяти замена произошла в ЯМР-структуре и сопровождалась ослаблением сохраняющейся межпептидной водородной связи с уменьшением ее энергии, E . Во всех остальных 18 межпептидных водородных связях α -спиралей: А, В, С — как

РСА-, так и ЯМР-структур, наиболее короткий — дородных связей, в среднем, больше в ЯМР-межпептидный O—N контакт и энергия этих во- структурах (табл. 5).

	<u>спираль А</u>	$d, \text{Å}$	$-E, \text{ккал/моль}$	<u>спираль В</u>	$d, \text{Å}$	$-E, \text{ккал/моль}$
РСА	OL8...NM12	2.8	3.03	ON27...NA31	2.9	2.34
ЯМР	OL8...CGM12	2.8	1.50	ON27...CBA31	3.0	1.92
РСА	OA10...NR14	2.9	2.57	OA31...NE35	2.8	2.33
ЯМР	OA10...CDR14	3.2	1.83	OA31...OE2E35	2.7	1.07
РСА	OA11...ND1H15	2.9	1.55			
ЯМР	OA11...NH15	2.9	1.98			

Дистанционные ограничения на разрыв внутриспиральных водородных связей отсутствуют в четвертой, более короткой, α -спирали и спирали 3_{10} РСА- и ЯМР-структур, а также в короткой С-концевой спирали 3_{10} РСА-структуры, которая превращается в α -спираль в ЯМР-структуре ЛЗК. Наряду с отмеченным выше и приведенным в табл. 5 увеличением значения $\langle d \rangle$ и уменьшением величины $\langle E \rangle$ 12 межпептидных водородных связей для этих спиральных сегментов средней ЯМР-структуры характерна повышенная динамическая нестабильность, она проявляется в некоторых из 50 моделей ЯМР-структур, где они дезорганизуются с превращением в различные повороты [23]. Такая степень динамической нестабильности этих сегментов противоречит данным Н—D обмена, согласно которым в растворе D₂O для 10 пептидных NH-групп внутриспиральных водородных связей этих сегментов вероятность деспирализации с демаскированием составляет 10^{-3} и меньше [34].

Вводимые при решении ЯМР-структуры ЛЗК дистанционные ограничения на присутствие межпептидных водородных связей распределены по значительной части его трехмерной структуры: α -домену с тремя α -спиралями и β -домену с тремя β -нитями. Их существование можно рассматривать и как аналогичное присутствию дополнительных ЯЭО, локальных в α -спиралях и дальних между β -нитями. За счет их вклада при формировании и энергетической минимизации ЯМР-структуры ЛЗК значения RMSD (1.49 Å) для атомов остова по сравнению с РСА-структурой оказались ненамного больше, чем для структуры Нб (1.45 Å), которая решалась с увеличенным в 1.3 раза количеством ЯЭО, но без ограничений на присутствие α -спиральных водородных связей (табл. 2). Введение дополнительных ограничений при решении ЯМР-структуры ЛЗК по программе X-PLOR сближает ее с ЯМР-структурами, решаемыми по другим программам. Аналогично КМ, у 37 таких ЯМР-структур среднее значение $\langle d \rangle$ межпептидных водородных связей короче, чем у 38 РСА-структур и 23 ЯМР-структур, решенных по программе X-PLOR [9].

Ограничения на присутствие межпептидных водородных связей вводили при решении по программе X-PLOR и первой ЯМР-структуры ЛЗК с меньшим количеством ЯЭО. Их увеличение в 1.4 раза, от 9 до 12.6, ЯЭО на остаток у второй ЯМР-структуры сократило почти также в 1.38 раз, от 2.33 до 1.69 Å, RMSD атомов остова относительно РСА-структуры. Параллельно улучшилось и качество ЯМР-структуры в 1.2 раза, с 54.5 до 65.9%, увеличилась доля остатков, заполняющих наиболее предпочтительную “кор”-область карты Рамачандрана [23]. До приведенных в таблицах 1 и 2 значений — 1.49 Å и 74.2% — обе эти величины дополнительно изменяются: соответственно уменьшаются и увеличиваются после включения в среднем на остаток ~1.6 дипольных ограничений при решении ЯМР-структуры ЛЗК. Но и в этой, второй, ЯМР-структуре ЛЗК доля остатков, заполняющих “кор”-область на 13% меньше, чем в РСА-структуре. У решенной по этой же программе X-PLOR ЯМР-структуры Нб доля остатков, заполняющих “кор”-область также на 11% меньше, чем в соответствующей РСА-структуре (табл. 1). Вместе с уже отмеченным увеличенным количеством коротких контактов пониженное содержание остатков с конформацией остова в “кор”-области рассматривается как характерное для ЯМР-структур, решенных по программе X-PLOR [21]. При решении ЯМР-структуры УБ по этой же программе, но с увеличением в 2–3 раза экспериментальной информации, количество ЯЭО и дипольных ограничений, заполнение “кор”-области достигает очень высокой величины 98.5%, что несколько больше, чем для РСА-структуры, а количество коротких контактов оказывается практически в интервале величин для 489 РСА-структур (табл. 1 и табл. 2). В ЯМР-структуре УБ средние длины и энергии всех 30 межпептидных водородных связей и 10 водородных связей α -спиралей, если и отличаются от РСА-структуры, то незначительно (табл. 5).

Как и для приведенной выше пары ЯМР-структур ЛЗК, увеличение в 2.8 раз, от 12.6 до 35.9, количества ЯЭО на остаток в ЯМР-структуре УБ относительно второй структуры ЛЗК сочетается с близким, в 3 раза (от 1.69 Å у ЛЗК до 0.56 Å у

УБ), уменьшением RMSD атомов остова относительно PCA-структуры. При решении ЯМР-структуры УБ с дополнительными 4.8 дипольными ограничениями на остаток величина RMSD для атомов остова сократилась до 0.45 \AA [22]. Среди четырех пар структур в структуре УБ наименьшие величины RMSD атомов остова ЯМР-структуры относительно PCA-структуры. Наименьшие также и величины $\langle \Delta d \rangle$ уменьшений значений $\langle d \rangle$ большинства преобладающих групп ОПК в ЯМР структуре $\langle d \rangle^+$ относительно PCA-структуры $\langle d \rangle^-$ (табл. 4). У таких групп УБ $\langle \Delta d \rangle$ в 2–3 раза меньше, чем у пары структур Hb, где $\langle \Delta d \rangle$ с величинами более близкими к характеризующим степень уменьшения $\langle d \rangle^+$ ЯМР-структур при сравнении дистанционной зависимости плотности межостаточных контактов в 60 парах ЯМР/PCA структур.

У УБ наименьшее среди четырех пар структур значение RMSD атомов остова ЯМР-структуры относительно PCA-структуры сочетается с наименьшим изменением содержания регулярной структуры: всего на 1% по сравнению с 10–17% для остальных (табл. 2). В ЯМР-структуре УБ количество коротких контактов в расчете на 100 остатков в 2.2 и 7 раз меньше, чем в ЯМР-структурах ЛЗК и Hb, решенных по такой же программе X-PLOR с уменьшенными ван-дер-ваальсовыми радиусами атомов, и ненамного превышает предел среднего количества коротких контактов в 489 PCA-структурах. Такое уменьшение количества коротких контактов в ЯМР-структуре УБ можно рассматривать как один из результатов значительного увеличения количества экспериментальных ЯМР-ограничений на положение атомов в этой структуре, которые не позволяют сильнее сближаться большому количеству атомов с уменьшенными радиусами X-PLOR при формировании и энергетической минимизации ЯМР-структуры.

Комбинацией значительно большего количества притягивающих и отталкивающих взаимодействий определяется положение атомов в нативной структуре белка. Поэтому при решении кристаллических структур белков по программе X-PLOR с уменьшенными радиусами атомов распределение по длинам межпептидных водородных связей в таких PCA-структурах оказывается таким же, как в PCA-структурах, решенных по другим программам [9]. По программе X-PLOR решена и PCA-структура Hb, сравниваемая с его ЯМР-структурой. И в этой PCA-структуре присутствует только один короткий контакт: межпептидная водородная связь, составляющая 0.7 контакта на 100 остатков при 100 коротких контактах в ЯМР-структуре Hb, решенной по программе X-PLOR (табл. 2).

При решении ЯМР-структур увеличение дистанционных ограничений ЯЭО может не только уменьшать различия между PCA-структурой и

средней ЯМР-структурой, но и сокращать степень динамической разупорядоченности средней ЯМР-структуры в растворе. У решенных по программе X-PLOR без дипольных ограничений ЯМР-структур ЛЗК при упомянутом увеличении в 1.4 раза количества ЯЭО в 3 раза, от 16 до 50, увеличен ансамбль ЯМР-структур и почти в 3 раза, от 1.71 ± 0.25 до $0.60 \pm 0.14 \text{ \AA}$, уменьшены значения RMSD атомов остова структур ансамбля относительно средней ЯМР-структуры. У этих энергетически минимизированных структур ансамбля сократились значения RMSD относительно идеализованной геометрии их ковалентной структуры: в 3.6 раз длин связей и в 8 раз углов связей, а также в 2.2 раза значений RMSD относительно экспериментальных ограничений ЯЭО [23, 35].

Четыре рассмотренных ЯМР-структуры: KM, УБ, Hb и ЛЗК – определены как средние соответственно из 8, 10, 29 и 50 рассчитанных моделей ансамблей ЯМР-структур. Среди обсуждавшегося набора из 60/61 пар ЯМР/PCA-структур присутствует 14, в которых ЯМР-структура представлена только одной моделью [9, 10]. Очевидно, поэтому 14 этих пар не использованы при опубликованных впоследствии результатах сравнительного анализа 148 пар ЯМР/PCA-структур с включением в табл. 1 других 30 из этих 60/61 пар [11]. При расчетах модели для определяемой средней ЯМР-структуры могут накладываться важные дополнительные структурные ограничения на допустимые интервалы расстояний между партнерами по межпептидным водородным связям O–NH и O–N. В качестве исходной информации для локализации таких водородных связей используются данные по скорости H–D обмена атомов пептидных NH-групп и температурной зависимости коэффициентов их химических сдвигов [23, 36]. Присутствием межпептидных водородных связей фиксируется положение сегментов с регулярной α - и β конформацией остова, чем в значительной степени определяется и общая форма молекулы белка, ее третичная структура. Вместо межпептидных водородных связей для локализации остатков в сегментах с регулярной вторичной структурой используются ограничения на двугранные углы остова ϕ и ψ , определяемые из величин химических сдвигов [15].

Для последующего повышения качества решенных ЯМР-структур может быть использовано их “перерешение” в окружении тонкого слоя молекул воды. При таком уточнении 100 ЯМР-структур улучшены различные параметры Z программы WHAT IF, увеличено содержание регулярной структуры и значительно уменьшено количество слишком коротких контактов [37]. Эти изменения в значительной степени могут индуцироваться появлением внутримолекулярных полярных и электростатических взаимодействий и притягивающей компоненты Леннард-Джонсо-

новского потенциала ван-дер-ваальсовских взаимодействий, которые отсутствовали до уточнения у этих решенных в вакууме по программе X-PLOR 100 ЯМР-структур. При уточнении увеличивается и количество межостаточных контактов, особенно заметно у поверхностных остатков в контакте с появившимися молекулами воды. В проанализированных специально 13 из 60 пар ЯМР-структур за счет такого увеличения сокращаются и различия в количестве межостаточных контактов между ними и РСА-структурами [9]. После уточнения в окружении молекул воды по программе CNW двух наборов ЯМР-структур для 545 белков исчезают или сильно сокращаются различия в рассчитанных для них средних величинах некоторых параметров Z программы WHAT IF, которые присутствовали между этими наборами ЯМР-структур, решенными в вакууме по программам CYANA с уменьшенными ван-дер-ваальсовыми радиусами атомов и CNS с нормальными радиусами [16].

Для оценки качества ЯМР-структур по программе PROCHECK-NMR проводится сопоставление с разрешением РСА-структур на основании распределения ϕ , ψ остатков по карте Рамачандрана, степени локализации в ее разрешенных областях [15, 38]. ЯМР-структуры 8 белков решены в вакууме по программе DYANA с ван-дер-ваальсовыми радиусами атомов без учета электростатических взаимодействий. После уточнения расчетами молекулярной динамики в окружении воды по программе CNS качество этих ЯМР-структур становится сопоставимо с РСА-структурами с разрешением 1.8–2.5 Å. В ЯМР-структурах восьми белков количество ЯЭО составляет от 14 до 26 на остаток [15]. В ЯМР-структуре УБ этот параметр достигает значения 35.9 на остаток, а качество структуры оценивается как эквивалентное РСА-структуре с разрешением 1.4 Å и 1.0 Å после уточнения в окружении воды [27].

α - и β -структуры: различия в геометрии остова и дистанционной зависимости разности плотности контактов 60 пар ЯМР/РСА-структур

Для возможной интерполяции к α - и β -структурным белкам рассмотрены данные о распределении по длинам групп ОПК в парах ЯМР/РСА структур КМ и УБ. Два белка сильно отличаются по внутриглобулярному взаимному расположению α - и β -структур. В молекуле КМ две ориентированные антипараллельно α -спирали образуют ножку Г образной структуры и две короткие β -нити – верхнюю перекладину с небольшим количеством контактов с α -спиралями ножки. В молекуле УБ единственная α -спираль погружена в поверхность близкой к сферической структуры, сформированной β -складчатой структурой из 5 нитей. В отличие от КМ контакты α -спирали с

окружением в структуре УБ не характерны для α -структурных белков и поэтому не приводятся ниже.

Средние длины (Å) межостаточных контактов в ЯМР/РСА-структурах

	остов–остов	остов–боковая группа	боковая группа–боковая группа
КМ α	3.15/3.15	3.54/3.80	3.9/3.7
КМ β	3.26/3.32	3.26/3.43	3.31/3.46
УБ β	3.31/3.34	3.45/3.43	3.67/3.55

Основные отличия между α - и β -структурами возникают из-за сильных различий в локальной геометрии полипептидного остова. При жестко и плотно скрученной спиральной α -конформации остова сближение с ним внешних контактов стерически ограничено и в ЯМР- и РСА-структурах КМ контакты остов–боковая группа на 0.40–0.65 Å длиннее контактов между атомами остова. Вместе с еще более длинными контактами между боковыми группами они образуют отдельную группу на дистанционной зависимости плотности контактов для α -спиральных белков в наборе из 60 пар ЯМР/РСА-структур [9]. В то же время у вытянутой β -полипептидной цепи КМ и УБ стерически облегчается возможность для сближения с атомами остова более объемных боковых групп и образование контактов остов–боковая группа со средней длиной такой же или только на 0.09–0.14 Å длиннее контактов между атомами остова. Объединяясь с ними и более длинными, но менее многочисленными контактами боковая группа–боковая группа, они образуют общую широкую группу на дистанционной зависимости разности плотности контактов для β -структурных белков в отличие от α -структурных белков [9]. Такие различия между α - и β -структурами возникают из-за различия в механизмах формирования регулярной вторичной структуры. У β -структуры она появляется при самоорганизации третичной структуры с возникновением дальних контактов вторичной структуры: межпептидных водородных связей и других межостаточных контактов β -структуры с необходимым подстроечным изменением локальных контактов. У α -структуры для организации вторичной α -спиральной структуры достаточно реорганизации локальных контактов – основное увеличение их количества и сокращение длины происходит на этой стадии, а затем, или одновременно с ней, появляются более длинные и более редкие межспиральные контакты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты ряда сравнительных исследований показывают, что в общем случае качество ЯМР-структур хуже, чем РСА-структур [12, 25, 37, 39, 40].

Различие в качестве может быть приписано значительно меньшему содержанию экспериментально доступной структурной информации и зависимости качества структуры от силового поля, используемого для уточнения ЯМР-структуры: X-PLOR, CNS, AMBER [25]. Оценка качества ансамблей ЯМР-структур проводится их сравнением с образцами хорошо решенных с использованием величин структурных параметров Z программы WHAT IF PCA-структур, представленными в Protein Data Bank. Если ориентироваться на величины Z, то качество даже наилучшим образом решенных ЯМР-структур 2002–2003 гг. ближе всего к PCA-структурам с разрешением $\sim 4 \text{ \AA}$ [25]. Последующее усовершенствование методов исследования и программ решения ЯМР-структур привело к заметному улучшению их качества, что можно наблюдать по структурам, депонированным в Protein Data Bank с января 2000 г. по август 2005 г. Среди этих 183 ЯМР-структур появилось достаточно много таких, качество которых приблизилось к PCA-структурам с разрешением 2.5–3.5 \AA , и только несколько ЯМР-структур приблизились к разрешению 1.8–2.5 \AA ; во многих случаях качество ЯМР-структур не достигают уровня PCA с низким разрешением [12].

Улучшение качества PCA-структур с увеличением разрешения – результат, прежде всего, увеличения количества структурной кристаллографической PCA-информации. Как отмечалось, в случае ЛЗК увеличение количества структурной ЯМР-информации улучшило качество ЯМР-структуры почти до уровня PCA-структуры. Количество такой информации увеличилось в 3 раза при исследованиях УБ, и качество соответствующей ЯМР-структуры классифицируется как эквивалентное PCA-структуре с разрешением 1.4 \AA , а значение RMSD для атомов остова относительно PCA-структуры в 2.7 раз меньше, чем для ЯМР-структуры ЛЗК относительно его PCA-структуры (табл. 2). Уровень этих отличий определяется как качеством ЯМР-структуры, так и степенью деформации “растворной” структуры белка под влиянием межмолекулярных контактов кристаллического окружения. В ЯМР-структуре ЛЗК и после ее сближения с PCA-структурой максимумы различий в положениях атомов остова сохранились на тех же сегментах, положение которых заметнее отличается в тетрагональной и триклинной кристаллических структурах белка. На этих же петлевых сегментах присутствуют и максимумы отличий в положениях атомов остова ансамбля ЯМР-структур ЛЗК от средней ЯМР-структуры и их амплитуды также уменьшаются при увеличении количества структурной ЯМР-информации [23, 35].

Авторы благодарны за очень полезное критическое обсуждение материалов статьи В.П. Кутышенко (Институт теоретической и эксперимен-

тальной биофизики РАН) и А.В. Финкельштейну (Институт белка РАН).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arseniev A.S., Kondakov V.I., Maiorov V.N., Bystrov V.F. 1984. NMR solution spatial structure of “short” scorpion insectotoxin I₃A. *FEBS Lett.* **165**, 57–62.
2. Williamson M.P., Havel T.F., Wüthrich K. 1985. Solution conformation of proteinase inhibitor IIA from bull seminal plasma by ¹H nuclear magnetic resonance and distance geometry. *J. Mol. Biol.* **182**, 295–315.
3. Brünger A.T., Clore G.M., Gronenborn A.M., Karplus M. 1986. Three-dimensional structure of proteins determined by molecular dynamics with interproton distance restraints: Application to crambin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 3801–3805.
4. Wagner G., Braun W., Havel T.F., Schaumann T., Gö N., Wüthrich K. 1987. Protein structures in solution by nuclear magnetic resonance and distance geometry: the polypeptide fold of the basic pancreatic trypsin inhibitor determined using the algorithms, DISGEO and DISMAN. *J. Mol. Biol.* **196**, 611–639.
5. Wu D., Jernigan R., Wu Z. 2007. Refinement of NMR-determined protein structures with database derived mean-force potentials. *Proteins.* **68**, 232–242.
6. Sakakibara D., Sasaki A., Ikeya T., Hamatsu J., Hanashima T., Mishima M., Yoshimasu M., Hayashi N., Mikawa T., Wälchli M., Smith B.O., Shirakawa M., Güntert P., Ito Y. 2009. Protein structure determination in living cells by in-cell NMR spectroscopy. *Nature.* **485**, 102–105.
7. Inomata K., Ohno A., Tochio H., Isogai S., Tenno T., Nakase I., Takeuchi T., Futaki S., Ito Y., Hiroaki H., Shirakawa M. 2009. High-resolution multi-dimensional NMR spectroscopy of proteins in human cells. *Nature.* **485**, 106–109.
8. Yee A., Gutmanas A., Arrowsmith C.H. 2006. Solution NMR in structural genomics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**, 611–617.
9. Garbuzynskiy S.O., Melnik B.S., Lobanov M.Yu., Finkelstein A.V., Galzitskaya O.V. 2005. Comparison of X-ray and NMR structures: is there a systematic difference in residue contacts between X-ray- and NMR-resolved protein structures? *Proteins.* **60**, 139–147.
10. Мельник Б.С., Гарбузинский С.А., Лобанов М.Ю., Галзитская О.В. 2005. Различия между белковыми структурами, определяемыми с помощью рентгеноструктурного анализа и ядерного магнитного резонанса. *Молекуляр. биология.* **39**, 129–138.
11. Andrec M., Snyder D.A., Zhou Z., Young J., Montelione G.T., Levy R.M. 2007. A large data set comparison of protein structures determined by crystallography and NMR: Statistical test for structural differences and the effect of crystal packing. *Proteins.* **69**, 449–465.
12. Bhattacharya A., Tejero R., Montelione G.T. 2007. Evaluating protein structures determined by structural genomics consortia. *Proteins.* **66**, 778–795.
13. Seeliger D., Groot B.L. 2007. Atomic contacts in protein structures. A detailed analysis of atomic radii, packing, and overlaps. *Proteins.* **68**, 595–601.

14. Snyder D.A., Bhattacharya A., Huang Y.J., Montelione G.T. 2005. Assessing precision and accuracy of protein structures derived from NMR data. *Proteins*. **59**, 655–661.
15. Liu G., Shen Y., Atreya H.S., Parish D., Shao Y., Sukumaran D.K., Xiao S., Yee A., Lemak A., Bhattacharya A., Action T.A., Arrowsmith C.H., Montelione G.T., Szyperski T. 2005. NMR data collection and analysis protocol for high-throughput protein structure determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**, 10487–10492.
16. Nederveen A.J., Doreleijers J.F., Vranken W., Miller Z., Spronk C.A.E.M., Nabuurs S.B., Güntert P., Livny M., Markley J.L., Nilges M., Ulrich E.L., Kaptein R., Bonvin A.M.J.J. 2005. RECOORD: A recalculated coordinate database of 500+ proteins from the PDB using restraints from the BioMagResBank. *Proteins*. **59**, 662–672.
17. Nilges M., Bernard A., Bardiaux B., Malliavin T., Habeck M., Rieping W. 2008. Accurate NMR structure through minimization of an extended hybrid energy. *Structure*. **16**, 1305–1312.
18. Nabuurs S.B., Spronk C.A.E.M., Vuister G.W., Vriend G. 2006. Traditional biomolecular structure determination by NMR spectroscopy allows for major errors. *PLoS Comput. Biol.* **2**, 71–79.
19. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. 2000. The protein data bank. *Nucl. Acids Res.* **28**, 235–242.
20. Spronk C.A.E.M., Nabuurs S.B., Bonvin A.M.J.J., Kriger E., Vuister G.W., Vriend G. 2003. The precision of NMR structure ensembles revisited. *J. Biomol. NMR*. **25**, 225–234.
21. Doreleijers J.F., Rullmann J.A.C., Kaptein R. 1998. Quality assessment of NMR structures: a statistical survey. *J. Mol. Biol.* **281**, 149–164.
22. Cornilescu G., Marquardt J.L., Ottiger M., Bax A. 1998. Validation of protein structure from anisotropic carbonyl chemical shifts in a dilute liquid crystalline phase. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 6836–6837.
23. Schwalbe H., Grimshaw S.B., Spencer A., Buck M., Boyd J., Dobson C.M., Redfield C., Smith L.J. 2001. A refined solution structure of hen lysozyme determined using residual dipolar coupling data. *Prot. Sci.* **10**, 677–688.
24. Bastolla U., Farwer J., Knapp E.W., Vendruscolo M. 2001. How to guarantee optimal stability for most representative structures in the protein data bank. *Proteins*. **44**, 79–96.
25. Spronk C.A.E.M., Nabuurs S.B., Krieger E., Vriend G., Vuister G.W. 2004. Validation of protein structures derived by NMR spectroscopy. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **45**, 315–337.
26. Doreleijers J.F., Ravest M.L., Rullmann T., Kaptein R. 1999. Completeness of NOEs in protein structures: A statistical analysis of NMR data. *J. Biomol. NMR*. **14**, 123–132.
27. Spronk C.A.E.M., Linge J.P., Hilbers C.W., Vuister G.W. 2002. Improving the quality of protein structures derived by NMR spectroscopy. *J. Biomol. NMR*. **22**, 281–289.
28. Caves L.S.D., Evanseck J.D., Karplus M. 1998. Locally accessible conformations of proteins: multiple molecular dynamics simulations of crambin. *Protein Sci.* **7**, 649–666.
29. Volkman B.F., Alam S.L., Satterlee J.D., Markley J.L. 1998. Solution structure and backbone dynamics of component IV *Glycera dibranchiate* monomeric hemoglobin-CO. *Biochemistry*. **37**, 10906–10919.
30. Ratnaparkhi G.S., Ramachandran S., Udgaonkar J.B., Varadarajan R. 1998. Discrepancies between the NMR and X-ray structures of uncomplexed barstar analysis suggests that packing densities of protein structures determined by NMR are unreliable. *Biochemistry*. **37**, 6958–6966.
31. Lee S.Y., Zhang Y., Skolnick J. 2006. TASSER-based refinement of NMR structures. *Proteins*. **63**, 451–456.
32. Bonvin A.M.J.J., Rullmann J.A.C., Lamerichs R.M.J.N., Boelens R., Kaptein R. 1993. “Ensemble” iterative relaxation matrix approach: a new NMR refinement protocol applied to the solution structure of crambin. *Proteins*. **15**, 385–400.
33. Whitlow M., Teeter M.M. 1986. An empirical examination of energy minimization using the well-determined structure of the protein crambin. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 7163–7172.
34. Radford S.E., Buck M., Topping K.D., Dobson C.M., Evans P.A. 1992. Hydrogen exchange in native and denatured states of hen egg-white lysozyme. *Proteins*. **14**, 237–248.
35. Smith L.J., Sutcliffe M.J., Redfield C., Dobson C.M. 1993. Structure of hen lysozyme in solution. *J. Mol. Biol.* **229**, 930–944.
36. Кутышенко В.П., Гущина Л.В., Христофоров В.С., Прохоров Д.А., Тимченко М.А., Кудреватых Ю.А., Федюкина Д.В., Филимонов В.В. 2010. Структура и динамика химерного белка SH3-F2 по данным ЯМР. *Молекуляр. биология*. **44**, 1064–1074.
37. Nabuurs S.B., Nederveen A.J., Vranken W., Doreleijers J.F., Bonvin A.M.J.J., Vuister G.W., Vriend G., Spronk C.A.E.M. 2004. DRESS: a database of refined solution NMR structures. *Proteins*. **55**, 483–486.
38. Laskowski R.A., Rullmann J.A.C., MacArthur M.W., Kaptein R., Thornton J.M. 1996. AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J. Biomol. NMR*. **8**, 477–486.
39. Wu D., Jernigan R., Wu Z. 2007. Refinement of NMR-determined protein structures with database derived mean-force potentials. *Proteins*. **68**, 232–242.
40. Ban Y.-E.A., Rudolph J., Zhou P., Edelsbrunner H. 2006. Evaluating the quality of NMR structures by local density of protons. *Proteins*. **62**, 852–864.