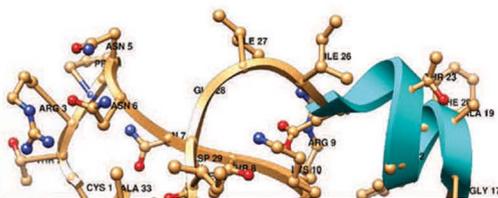


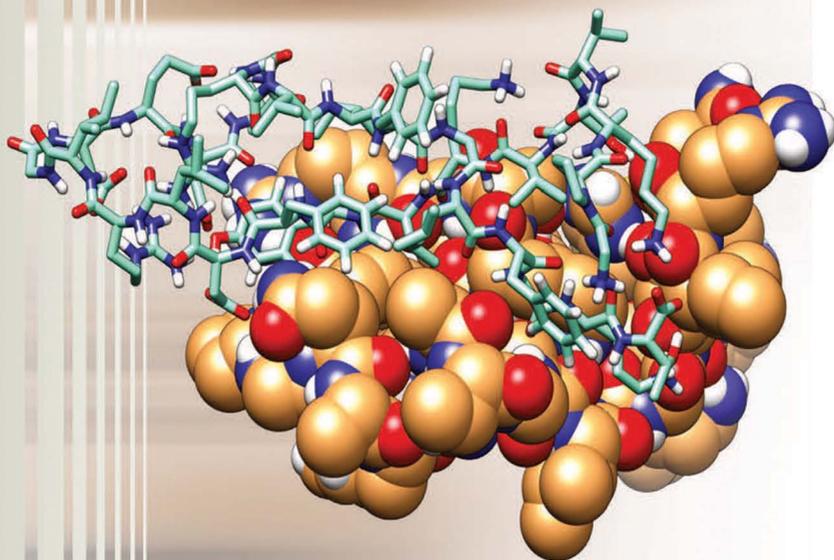


А. М. Андрианов

КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ:



ТЕОРИЯ
И ПРИЛОЖЕНИЯ



УДК 577.322.4

Андрианов, А. М. Конформационный анализ белков: теория и приложения / А. М. Андрианов. – Минск: Беларус. навука, 2013. – 518 с. – ISBN 978-985-08-1529-3.

В книге обобщены современные подходы к компьютерному моделированию пространственной структуры белков, включающие методы конформационного ЯМР-анализа, *ab initio* фолдинга, сопоставительного моделирования, имитации теплового отжига, молекулярной динамики, молекулярного докинга и ряд других. Рассмотрены различные аспекты проблемы молекулярного моделирования структуры белков. Дан критический анализ методов, описаны соответствующие алгоритмы и приведены примеры их применения для предсказания белковых структур. Особое внимание уделено практическому использованию методов моделирования структуры белков *in silico* для конструирования потенциальных лекарственных препаратов.

Предназначена для научных сотрудников – специалистов, работающих в области молекулярной биологии, биофизики, биоинформатики, биоорганической химии, биомедицины и смежных дисциплин.

Табл. 59. Ил. 98. Библиогр.: 913 назв.

Р е ц е н з е н т ы:

доктор химических наук О. В. Свиридов,
доктор биологических наук, профессор Д. Ю. Ландо,
кандидат физико-математических наук Ю. А. Соколов

ISBN 978-985-08-1529-3

© Андрианов А. М., 2013

© Оформление. РУП «Издательский дом
«Беларуская навука», 2013

ВВЕДЕНИЕ

Специфика пространственной организации и конформационные свойства белковых молекул лежат в основе практически всех биологических процессов, обуславливая их высокую эффективность и строгую избирательность. В связи с этим решение многих биологических задач непосредственно связано с необходимостью изучения трехмерных структур белков, а проблема их пространственной организации – одна из самых актуальных не только для биофизики и молекулярной биологии, но и для ряда смежных с ними дисциплин (медицины, фармакологии), развитие которых в значительной степени определяется уровнем знаний в данной области.

Исследование трехмерных структур белков является одной из основ для развития важнейшего направления современной молекулярной биологии – белковой инженерии. Изучение функции белков (в частности, описание механизмов их взаимодействия с другими молекулами) требует знания тонких деталей не только их глобальной структуры, но и конформаций индивидуальных аминокислотных остатков (локальной структуры). Среди множества физико-химических методов исследования пространственной структуры белковых молекул рентгеноструктурный анализ является наиболее информативным с точки зрения описания их структуры на атомном уровне. В настоящее время с его помощью получена широкая база данных о пространственной структуре белков в кристаллической форме [1]. Однако этот метод требует огромных затрат: кроме препаративных и технических трудностей, связанных с подготовкой объекта исследования и его рентгеновской съемкой, имеется много сложностей при интерпретации карт электронной плотности, построении и уточнении модели белковой молекулы. Кроме того, многие белки (особенно с небольшой молекулярной массой) формируют плохо упорядоченные или небольшие кристаллы, а в отдельных случаях не образуют их вообще. К тому же получаемая методом рентге-

ноструктурного анализа модель структуры является статической, а конформационные свойства белковой молекулы, функционирующей при физиологических условиях в растворе, могут существенно отличаться от ее свойств в кристаллическом состоянии.

Поиск ответов на вопросы о том, какова структура молекулы в нативном состоянии, какими могут быть кратковременные конформационные состояния, обеспечивающие выполнение молекулой ее биологических функций, требует развития других экспериментальных методов, таких, например, как КД-, ИК- и рамановская спектроскопия, спектроскопия ЯМР высокого разрешения, резонансное комбинационное рассеяние, флуоресцентный анализ, ЭПР-спектроскопия. Наиболее перспективными из перечисленных методов являются методы спектроскопии ЯМР. В 80–90-е годы прошлого века был достигнут значительный прогресс в экспериментальных технологиях получения многомерных спектров ЯМР биополимеров (см., например, обзоры [2–14]). В 2002 г. швейцарский ученый Курт Вютрих – основоположник этого направления – стал лауреатом Нобелевской премии по химии «за развитие спектроскопии ядерного магнитного резонанса для определения трехмерной структуры биологических макромолекул в растворе». Методы спектроскопии ЯМР являются в настоящее время единственным источником, позволяющим получить детальную информацию о пространственной организации белков в условиях, максимально приближенных к физиологическим [15, 16]. С помощью спектроскопии ЯМР можно получать информацию о химических сдвигах протонов и пространственной близости отдельных пар атомов белковой молекулы, измерять величины констант спин-спинового взаимодействия, идентифицировать амидные группы, участвующие в образовании внутримолекулярных водородных связей. Процедуры для получения экспериментальной информации, включающей геометрические ограничения на трехмерную структуру белка, подробно описаны в ряде обзорных работ (см., например, [2–16]). Возможность получения этих данных, содержащих в неявном виде структурную информацию, обусловила необходимость разработки теоретических методов, предназначенных для преобразования спектральных параметров ЯМР в атомные координаты макромолекулы.

С одной стороны, методы моделирования пространственной структуры белков по данным рентгеноструктурного анализа и спектроскопии ЯМР имеют много общих черт, поскольку в обоих случаях конечным результатом экспериментальных исследований является набор геометрических характеристик, на основе которых и устанавливается трехмерная структура молекулы. Так как построение модели по ограниченному набору геометрических ограничений относится к классу некорректных физических задач (структура, удовлетворяющая набору экспериментальных ограничений, является не единственной), в обоих случаях возникает необходимость привлечения дополнительной системы ограничений, включающей априорную информацию о «стандартной» геометрии аминокислотных остатков, а также сведения об общих принципах структурной организации белков. Однако, с другой стороны, существует принципиальное различие между экспериментальными данными двух методов, которое должно быть обязательно учтено при их анализе в процессе построения структурной модели белка.

Так, в случае рентгеноструктурного анализа трехмерная структура молекулы может быть установлена непосредственно из дифракционной картины, являющейся функцией координат атомов; при этом электронная плотность каждого атома вносит вклад в интенсивность дифракционной картины. Иными словами, дифракционная картина содержит данные о полной структуре молекулы, на основе которых путем фурье-преобразования строится карта электронной плотности и осуществляется расчет координат ее атомов. Рентгеновские данные, измеренные с высокой точностью, позволяют провести корректную расшифровку трехмерной структуры белков, причем их локальная конформация (двугранные углы φ , ψ , χ аминокислотных остатков) определяется после построения пространственной укладки полипептидной цепи как результат процесса моделирования. Однако рентгеновские данные весьма чувствительны к кристаллизационным свойствам молекулы, структура которой зависит от способа упаковки молекул в кристаллической ячейке, что вносит неопределенность в координаты атомов.

В отличие от метода рентгеноструктурного анализа данные спектроскопии ЯМР не зависят от кристаллизационных свойств мо-

лекулы, однако являются функцией ее геометрической формы и времени. Интенсивности кросс-пиков ЯЭО, химические сдвиги и константы спин-спинового взаимодействия очень чувствительны к эффектам, проявляющимся на небольших расстояниях, и поэтому содержат более полную информацию о локальной геометрии молекулы, чем о ее пространственной структуре. В связи с этим проблема моделирования пространственной структуры пептидов и белков на основе данных спектроскопии ЯМР не может быть успешно решена путем прямого математического преобразования экспериментальной информации в координаты атомов. В этом случае должна быть использована иная стратегия расчета, включающая несколько последовательных этапов. Для предотвращения ситуации, когда даже единственный ошибочно отнесенный сигнал может привести к некорректной трехмерной структуре, на первом этапе анализа данных ЯМР необходимо определить локальную конформацию белка (определение структуры в геометрическом пространстве двугранных углов), используя для этой цели наиболее надежную часть экспериментальных данных. На последующих этапах пространственная структура молекулы (определение структуры в геометрическом пространстве координат атомов) может быть построена и уточнена на основе другой доступной экспериментальной информации.

Несмотря на то что в настоящее время рентгеноструктурный анализ и спектроскопия ЯМР являются основными методами определения пространственной структуры биологических макромолекул (белков, вирусов, нуклеиновых кислот) и их комплексов при атомном разрешении, не всегда возможностей этих методов достаточно для решения практических задач. В отличие от технологий секвенирования последовательности ДНК геномов живых организмов экспериментальное определение пространственной структуры белков еще не стало настолько автоматизированным, чтобы структуру любой белковой молекулы можно было бы установить с фиксированными временными и материальными затратами. Наряду с упомянутыми выше ограничениями метода рентгеноструктурного анализа наиболее сложным моментом при его использовании является получение белкового кристалла, образующего при облучении четкую и качественную дифракционную картину, пригодную для определения

трехмерной структуры. Условия, в которых белки образуют упорядоченную фазу, называемую белковым кристаллом, зачастую подобрать очень сложно, и во многих случаях уходят годы упорных экспериментов, прежде чем появляются первые результаты. Метод спектроскопии ЯМР также имеет ряд ограничений, связанных с размером исследуемых молекул, получением достаточных количеств изотопно-меченных образцов белков и расшифровкой спектров ЯМР. Особенно остро проблемы обоих экспериментальных методов встают в случае работы со сложными белковыми комплексами или интегральными белками клеточных мембран. Для интегральных белков клеточных мембран дело усугубляется гетерогенностью и сложной организацией молекулярного окружения, в котором существуют эти молекулы. В изучении мембранных белков наиболее сложной проблемой является задача корректного встраивания очищенной или синтезированной белковой молекулы в липидные агрегаты, «изображающие» мембрану в эксперименте, – например, мицеллы или липосомы.

В ситуации, когда экспериментальные данные об организации исследуемого белка отсутствуют и получить их крайне сложно и затратно или принципиально невозможно, разумной альтернативой становится область теоретической молекулярной биофизики, которую в общем виде именуют компьютерным экспериментом или экспериментом *in silico*. В биологических исследованиях компьютеры и суперкомпьютеры становятся все более самостоятельным инструментом познания и получения прикладных результатов. Предсказание пространственной структуры белков по аминокислотной последовательности, т. е. фактически по последовательности нуклеотидных пар в ДНК, является одной из центральных задач компьютерной биологии. Важность решения этой задачи состоит еще и в том, что число известных аминокислотных последовательностей белков, установленных по известным нуклеотидным последовательностям ДНК, намного превосходит число известных пространственных белковых структур. В настоящее время для решения проблемы предсказания структуры белков разработано большое число приближенных подходов. Один из наиболее эффективных – использование информации о гомологии, т. е. о пространственной структуре белков,

обладающих первичной структурой, близкой к исследуемому белку. Важнейшей прикладной задачей компьютерной биологии является применение вычислительных алгоритмов, используемых для анализа и систематизации генетической информации, выяснения структуры, динамики и функции макромолекул для создания новых лекарственных препаратов.

В первой части книги (гл. 1–6) рассмотрены различные подходы к решению проблемы моделирования пространственной структуры белков по данным спектроскопии ЯМР. Обобщены традиционные и нетрадиционные методы конформационного ЯМР-анализа, описаны соответствующие алгоритмы и приведены примеры их применения для предсказания белковых структур. Значительное внимание уделено вероятностному подходу к структурной интерпретации спектров ЯМР, в котором на первом этапе анализа спектральных данных рассчитывается локальная структура белка, а на последующих этапах строится его пространственная структура, удовлетворяющая набору всей имеющейся экспериментальной информации.

Во второй части книги (гл. 7–9) обсуждены теоретические процедуры моделирования белковых структур, основанные на физических или эмпирических приближениях и не использующие в явном виде экспериментальные данные. Описаны используемые в рамках этих процедур методы, такие как *ab initio* фолдинг белков, имитация теплового отжига, сопоставительное моделирование, молекулярная динамика, молекулярный докинг и ряд других, и показана их роль в современных подходах к созданию новых лекарств. Рассмотрены различные аспекты проблемы молекулярного моделирования, дан критический анализ методов расчета структуры белков *in silico* и приведены примеры их практического использования для конструирования потенциальных лекарственных препаратов против СПИДа.

Автор выражает искреннюю благодарность рецензентам книги О. В. Свиридову, Д. Ю. Ландо и Ю. А. Соколову за ценные советы и замечания, а также И. В. Анищенко и Ю. В. Корноушенко, совместно с которыми написаны отдельные параграфы гл. 8 и 9.

часть 1

КОНФОРМАЦИОННЫЙ
АНАЛИЗ БЕЛКОВ
ПО ДАННЫМ
СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР

**СПЕКТРОСКОПИЯ ЯМР
И ТРЕХМЕРНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКОВ.
ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОБЛЕМЫ**

**1.1. Основные этапы
конформационного ЯМР-анализа белков**

Основные этапы конформационного ЯМР-анализа белковых молекул и последовательность их выполнения в полном объеме сформулированы в работе [17]: 1) выделение сигналов протонов в спектрах ЯМР и отнесение их к конкретным аминокислотным остаткам полипептидной цепи; 2) оценка степени подвижности молекулы в различных условиях окружения; 3) выявление специфических меж- и внутримолекулярных взаимодействий, таких как водородные связи, электростатические диполь-дипольные взаимодействия, гидрофобные взаимодействия; идентификация мест связывания с металлом и групп, контактирующих с растворителем; 4) установление пространственной структуры молекул, для которых характерна фиксированная или доминирующая конформация в растворе; 5) изучение локальных конформационных перестроек, индуцированных изменением среды, и специфических межмолекулярных взаимодействий.

Отнесение сигналов протонов к определенному положению ядер в первичной структуре является исходной предпосылкой для успешного проведения конформационного ЯМР-анализа пептидов и белков [18–21]. Поэтому разработка и совершенствование эффективных методик, обеспечивающих однозначное отнесение сигналов в спектрах ЯМР, служат основой конформационных исследований белковых молекул в растворе. До начала 80-х годов XX в. для решения этой задачи в экспериментах ЯМР широко использовался гетероядерный двойной резонанс (см., например, [22, 23]).

Развитые в последующие годы методы многомерной спектроскопии ЯМР [24–41] значительно упростили процедуру отнесения сигналов протонов и предоставили возможность детально исследовать систему близких межпротонных контактов в изучаемых соединениях (см., например, [17, 42, 43]). Так как аминокислотные остатки одного типа встречаются в полипептидной цепи молекулы в общем случае неоднократно, процедура отнесения состоит из двух последовательных этапов (см., например, [22]). На первом этапе осуществляется разделение остатков по типам протонных систем. Возможность такой дифференциации обусловлена тем, что в спектре ^1H -ЯМР проявляются только внутримолекулярные геминальные (через две химические связи) и вицинальные (через три химические связи) взаимодействия, т. е. каждый из двадцати типов аминокислотных остатков может быть рассмотрен независимо и классифицирован на основании их различий по числу протонов в N, α , β , γ , δ и ϵ -положениях (подробности см. в [17, 22]).

При установлении спиновых систем аминокислотных остатков с помощью 1D-спектроскопии ЯМР широко применяется селективный многочастотный резонанс в сочетании с разностной спектроскопией [24]. Для решения этой задачи в методиках многомерной спектроскопии ЯМР используются корреляционные эксперименты (см., например, [44–48]). Последующее отнесение выделенных сигналов к конкретным остаткам аминокислотной последовательности осуществляется с помощью ЯЭО между амидным протоном NH ($i + 1$)-го остатка и протонами C^αH , NH, C^βH остатка i (рис. 1.1, соответственно $d_{\alpha\text{N}}$ -, d_{NN} - и $d_{\beta\text{N}}$ -связи). В работе [19] на основе статистического анализа девятнадцати структур белковых молекул показано, что по крайней мере одно из этих расстояний в большинстве случаев меньше 3 Å. При этом если одна d -связь короче 3 Å, достоверность определения соседнего остатка в полипептидной цепи составляет приблизительно 80 %, а при наличии в спектре ЯЭО двух или трех d -связей надежность отнесения сигналов превышает 90 % [19].

Следует подчеркнуть, что для отнесения сигналов необходимо знать аминокислотную последовательность белковой моле-

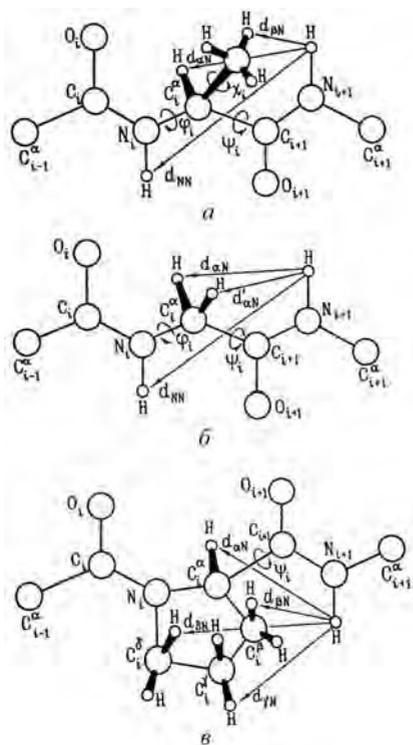


Рис. 1.1. Фрагменты остова полипептидной цепи: *a* – дипептидная единица аланина; *б* – глицина; *в* – пролина (стрелками указаны межпротонные расстояния)

цу и наоборот), что позволяет получить последовательное отнесение сигналов протонов в пределах небольших фрагментов, содержащих от двух до восьми остатков [18, 28, 48].

Когда макромолекула может находиться в двух состояниях или более, независимое отнесение сигналов для каждого из них представляет собой сложную задачу. Однако если имеют место конформационные переходы между различающимися формами и спектр ЯМР для одной из них достаточно детально охарактеризован, сигналы другой формы анализируются с помощью

кулы и получить в растворе COSY- и SECSY-спектры, в которых присутствуют сигналы всех амидных протонов NH (см., например, [25]). Для упрощения анализа сильно перекрывающихся спектральных областей, содержащих сигналы от амидных протонов, эффективно применять сопоставление спектров, которые получены при близких экспериментальных условиях в растворах H_2O и 2H_2O [18, 26, 27]. Однозначно отнесенная спиновая система или уникальный аминокислотный остаток (Gly, Ala, Val, Thr, Ile) служат отправной точкой, с которой начинается процедура отнесения сигналов вдоль полипептидной цепи через *d*-связи. При этом в некоторых случаях остатки могут быть идентифицированы в обоих направлениях (от N- к C-концу и наоборот), что позволяет получить последовательное отнесение сигналов протонов в пределах небольших фрагментов, содержащих от двух до восьми остатков [18, 28, 48].

спектроскопии химического обмена (EXCTSY) [49], в результате которой осуществляется корреляция химических сдвигов сигналов для каждого из состояний.

В настоящее время разработаны различные методические приемы, позволяющие проводить надежные отнесения сигналов протонов в многомерных спектрах ЯЭО с использованием компьютерных средств [50–62]. Отнесения сигналов протонов к конкретным аминокислотным остаткам полипептидной цепи с использованием наблюдаемых в спектрах ЯЭО d -связей выполнены для большого числа пептидов и белков. Эти данные использованы при исследовании их пространственной структуры методами компьютерного моделирования (см., например, работы [63–66]).

В целом пространственная структура белковой молекулы определяется большим числом параметров, поэтому при установлении третичной структуры макромолекулы по данным спектроскопии ЯМР необходимо обеспечить выполнение ряда условий, связанных как с экспериментальными, так и с теоретическими ограничениями. Основными среди них являются следующие [67]: 1) межатомные расстояния в молекуле должны соответствовать $d_{\alpha N^-}$, d_{NN^-} , $d_{\beta N^-}$ -связям и данным о ЯЭО между протонами удаленных по валентной цепи остатков; 2) двугранные углы φ и χ_1 должны удовлетворять КССВ ${}^3J_{H-NC\alpha-H}$ и ${}^3J_{H-C\alpha C\beta-H}$; 3) найденные из данных о скоростях дейтерообмена группы NH с медленно обменивающимися протонами должны быть донорами внутримолекулярных водородных связей или экранированы от растворителя; 4) молекула должна иметь плотную упаковку и находиться в энергетическом минимуме.

Набор внутримолекулярных расстояний между отдельными парами пространственно сближенных протонов, установленный на основе анализа спектров ЯЭО с различными значениями времен смешивания компонентов намагниченности τ_m [68–71], дает наиболее ценную информацию о полной третичной структуре белковой молекулы. При этом данные о d -связях содержат сведения о конформациях индивидуальных аминокислотных остатков, а информация о пространственной сближенности протонов

удаленных по валентной цепи остатков характеризует вполне определенную пространственную укладку полипептида.

Данные о d -связях, полученные при отнесении резонансов в спектре ^1H -ЯМР, используются для оценки расстояний между конкретными протонами в аминокислотной последовательности молекулы. Эти расстояния привлекаются на следующем этапе для определения элементов вторичной структуры. Критерии, используемые при идентификации регулярных вторичных структур (α -спираль, β -структура), основаны на анализе характерных для рассматриваемой вторичной структуры ЯЭО-связей между протонами соседних и удаленных по цепи остатков, вицинальных констант $^3J_{\text{H-NC}^\alpha\text{-H}}$ и $^3J_{\text{H-C}^\alpha\text{C}^\beta\text{-H}}$, скоростей дейтерообмена амидных протонов с растворителем [72–75]. Так, в случае α -спиральной конформации в спектрах ЯЭО проявляются d_{NN} - и $d_{\beta\text{N}}$ -связи (при этом наличие d_{NN} -связи обязательно), а $d_{\alpha\text{N}}$ -связь отсутствует [18, 19, 28] (межпротонное расстояние в правой α -спирали равно приблизительно 3,5 Å [19]). В работе [18] показано, что в α -спиральном фрагменте ПИТБ проявляются ЯЭО, соответствующие d_{NN} - и $d_{\beta\text{N}}$ -связям между протонами смежных остатков. Правая α -спираль характеризуется также низким значением КССВ $^3J_{\text{H-NC}^\alpha\text{-H}} - 2-4$ Гц [76]. При определении участков правой α -спирали, кроме того, могут быть использованы данные о специфических ЯЭО-связях $\text{C}_i^\alpha\text{H} - \text{C}_{i+3}^\beta\text{H}$ и $\text{C}_i^\alpha\text{H} - \text{N}_{i+3}\text{H}$ [73, 75].

В отличие от спиральных фрагментов для вытянутых участков полипептидной цепи (например, для β -структур) характерно обязательное наличие только $d_{\alpha\text{N}}$ -связи [19] (межпротонное расстояние $d_{\alpha\text{N}}$ в β -структурах равно приблизительно 2,2 Å [43, 77]). Значения вицинальных констант $^3J_{\text{H-NC}^\alpha\text{-H}}$ в этом случае изменяются в интервале 8–10 Гц [76]. В антипараллельной β -структуре, образованной комбинацией двух вытянутых фрагментов, ЯЭО проявляются между парами протонов C^αH или амидных протонов остатков, расположенных на противоположных участках β -структуры [43]. Специфические контакты ЯЭО наблюдаются и в β -изгибах полипептидной цепи. Например, в β -изгибе типа I расстояния d_{NN} для остатков, расположенных

в положениях $i + 1$ и $i + 2$, равны соответственно 2,6 и 2,4 Å, в то время как в β -изгибе II они составляют 4,5 и 2,4 Å [75, 78]. Подробный анализ контактов ЯЭО, характерных для регулярных вторичных структур и стандартных β -изгибов, выполнен Вютрихом и соавт. в работе [75]. Особенности спектров ЯМР для нерегулярных областей белков обсуждены в работах [79–81].

Ошкинат и соавт. [78], исследуя методами 3D спектроскопии ЯМР молекулу ПИТЬ, показали, что интегральные амплитуды кросс-пиков, наблюдаемых в 3D TOCSY-NOESY спектрах, формируют специфические наборы данных, которые могут быть использованы для количественного анализа отдельных элементов вторичной структуры белков. Так, величины интенсивностей 3D кросс-пиков, измеренные для областей молекулы, где расположены β -структура и β -изгибы, содержат более полную (по сравнению с 2D спектрами ЯМР) информацию о конформационных состояниях соответствующих участков полипептидной цепи. В большинстве случаев амплитуды 3D кросс-пиков согласуются с их значениями, оцененными на основе качественного анализа двумерных спектров. В то же время 3D кросс-пики, проявляющиеся в α -спиралях ПИТЬ, имеют небольшие амплитуды. Поэтому использование 3D спектроскопии ЯМР не приводит в данном случае к заметному улучшению качества описания α -спиральных фрагментов молекулы.

Перечисленные выше критерии были применены при анализе вторичной структуры практически всех исследованных методами многомерной спектроскопии ЯМР пептидов и белков (см., например, работы [82–102]).

При идентификации элементов вторичной структуры, стабилизированных водородными связями между карбонильными и амидными атомами основной цепи [103], используются также данные о скоростях дейтерообмена амидных протонов с растворителем [104–106], значения химических сдвигов NH [107], а также их температурные зависимости [104, 105]. Авторами работы [107] представлены результаты статистического анализа химических сдвигов сигналов протонов $C^{\alpha}H$ в 32 пептидах и белках, содержащих от 27 до 129 аминокислотных остатков.

Анализ распределения химических сдвигов проводился ими с учетом принадлежности остатков к участкам вторичной (α -спираль или вытянутая β -листовая конформация) и неупорядоченной структуры. Установлено, что для алифатических остатков (Ala, Val, Leu, Ile, Lys) наблюдаются заметные различия химических сдвигов сигналов $C^\alpha H$ в зависимости от разновидности элементов вторичной структуры. Эти остатки, находящиеся в регулярной спиральной конформации, проявляют высокопольный сдвиг $C^\alpha H$ протонов в среднем на 0,4 м. д. от их положения в неупорядоченной конформации. Для β -структурных областей наблюдается низкопольный сдвиг сигналов $C^\alpha H$ в среднем на 0,4 м. д. по сравнению с неупорядоченной конформацией. Для остатков, содержащих ионизируемые группы в β - и γ -положениях (Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Met, Ser, Thr), а также ароматических остатков зависимости химических сдвигов $C^\alpha H$ протонов от принадлежности остатка к фрагментам вторичной структуры не обнаружено. Подробный анализ взаимосвязи между величинами химических сдвигов и вторичной структурой белков проведен в работах [107–111].

На следующем этапе конформационного анализа с помощью ЯЭО-связей между протонами, принадлежащими фрагментам разных вторичных структур, определяется взаимное расположение участков вторичной структуры. Например, эффективность такого подхода продемонстрирована при расшифровке пространственной структуры инсектотоксина I₅A [67, 112, 113] и определении взаимной ориентации трех α -спиралей в N-концевом фрагменте lac-репрессора из *E. coli* [114].

На заключительном этапе построения полной третичной структуры молекулы используется весь набор контактов ЯЭО, включающий как внутриостаточные взаимодействия, так и взаимодействия между пространственно сближенными остатками. При исследовании тонких деталей структуры наряду с данными о ЯЭО должен быть рассмотрен весь имеющийся набор параметров спектроскопии ЯМР.

Среди многочисленных взаимодействий, обусловленных изотопами с магнитно-активными ядрами 1H , ^{13}C и ^{15}N , наиболее

информативны с точки зрения структурных исследований спин-спиновые взаимодействия, проявляющиеся через три химические связи (вицинальные взаимодействия). Широкое применение вицинальных констант в конформационном анализе белковых молекул связано с тем, что они содержат информацию о двугранных углах φ , ψ , χ_1 аминокислотного остатка [17]. Значения отдельных углов внутреннего вращения в белковой молекуле могут быть оценены на основании КССВ ${}^3J_{\text{H-NC}^\alpha\text{-H}}$ (углы φ) и ${}^3J_{\text{H-C}^\alpha\text{C}^\beta\text{-H}}$ (углы χ_1). Изучение методами ЯМР и инфракрасной спектроскопии конформационных свойств дипептидов в предположении соблюдения общего вида соотношения Карплюса [115, 116] позволило установить зависимость межпротонного взаимодействия $\text{H-NC}^\alpha\text{-H}$ от двугранного угла φ [117, 118], которая в результате последующих исследований пептидов получила окончательное выражение [119]. Возможности применения этой константы для белков также проанализированы в литературе (см., например, [120, 121]). Величины χ_1 в боковых цепях могут быть оценены с помощью соответствующих вицинальных констант [76, 122, 123]. Следует отметить, что определение двугранных углов по данным о КССВ затруднено, так как, согласно эмпирически установленным зависимостям КССВ от φ и χ_1 , одному значению вицинальной константы в общем случае соответствуют четыре разных значения угла внутреннего вращения [76]. Для устранения этой неоднозначности применяются гетероядерные взаимодействия ${}^{13}\text{C}\dots{}^1\text{H}$ [24, 76] и ЯЭО [19]. В [124] выполнены теоретические расчеты зависимости вицинальных констант от угла φ для взаимодействий ${}^1\text{H-NC}^\alpha\text{-}{}^{13}\text{C}'(\text{O})$, ${}^1\text{H-NC}^\alpha\text{-}{}^{13}\text{C}^\beta$ и ${}^{13}\text{C}'(\text{O})\text{-NC}^\alpha\text{-}^1\text{H}$. Совместный анализ графиков полного набора вицинальных констант для фрагмента с пептидной связью N-C^α позволяет однозначно оценить величину торсионного угла φ [17]. На практике такой подход был успешно применен при установлении пространственной структуры циклического депептида валиномицина [125, 126]. При этом для однозначного определения углов φ привлекались величины вицинальных констант ${}^1\text{H-NC}^\alpha\text{-}^1\text{H}$, ${}^1\text{H-NC}^\alpha\text{-}{}^{13}\text{C}^\beta$ и ${}^{13}\text{C}'\text{-NC}^\alpha\text{-}^1\text{H}$, а конформационный анализ боковых цепей аминокислотных

остатков был проведен с использованием КССВ протонов $^1\text{H}-\text{C}^\alpha\text{C}^\beta-\text{H}$ и $^1\text{H}-\text{C}^\alpha\text{C}^\beta-^{13}\text{C}'$. Полученная в результате структурной интерпретации КССВ доминирующая конформация валиномицина в неполярной среде согласуется с данными рентгеноструктурного анализа.

Весьма существенным фактором при анализе вицинальных констант является степень конформационной подвижности молекулы. В относительно лабильных участках остова следует учитывать еще одно (кроме четырехкратного вырождения) ограничение на использование КССВ $^3\text{J}_{\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H}}$: наиболее заселенные значения угла φ (от -60 до -90 и от -150 до -180°) соответствуют наиболее крутому участку на кривой Карплюса–Быстрова (например, разность $^3\text{J}_{\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H}}(-90^\circ) - ^3\text{J}_{\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H}}(-80^\circ) \cong 2$ Гц), т. е. небольшие изменения угла φ приводят к значительному разбросу величины $^3\text{J}_{\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H}}$. Поэтому необходимо отметить, что наиболее часто встречающиеся значения $^3\text{J}_{\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H}} = 6-8$ Гц малоинформативны для конформационного ЯМР-анализа. При анализе конформационных возможностей боковых цепей фрагментов, для которых характерна внутренняя лабильность, применяется зависимость КССВ $^3\text{J}_{\text{H}-\text{C}^\alpha\text{C}^\beta-\text{H}}$ от заселенностей вращательных состояний [76], а при исследовании жестких участков белковых молекул могут быть использованы зависимости КССВ $^3\text{J}_{\text{H}-\text{C}^\alpha\text{C}^\beta-\text{H}}$ от угла χ_1 [76, 120, 121, 123].

Сопоставление КССВ $^3\text{J}_{\text{H}-\text{C}^\alpha\text{C}^\beta-\text{H}}$, экспериментально измеренных из спектров ^1H -ЯМР и рассчитанных с помощью соотношения [116] по данным рентгеноструктурного анализа, показывает, что в глобулярных белках для большинства аминокислотных остатков имеет место хорошее соответствие (в пределах значений угла $\pm 30^\circ$) между этими величинами [120, 121]. Особый интерес представляют остатки с двумя протонами в β -положении. Основанный на взаимном соответствии двух КССВ $^3\text{J}_{\text{H}-\text{C}^\alpha\text{C}^\beta-\text{H}}$ и $^3\text{J}_{\text{H}-\text{C}^\alpha\text{C}^\beta-\text{H}'}$ метод распознавания предельных динамических ситуаций (конформационно подвижной и конформационно жесткой) [121] позволяет получать необходимые сведения о микроокружении боковых цепей остатков, исследовать статические и динамические характеристики пространственной структуры

и устанавливая доступные растворителю участки молекулы. Разработаны экспериментальные методики, позволяющие измерять гомо- и гетероядерные вицинальные КССВ с высокой точностью (см., например, работы [127–130]).

Таким образом, рассмотренные выше спектральные данные ЯМР содержат достаточно подробную информацию о структурных параметрах исследуемой молекулы, что позволяет в отдельных случаях построить корректную трехмерную структуру без привлечения методов компьютерного моделирования. Так, например, на основе анализа КССВ вицинальных протонов совместно с данными о скоростях дейтерообмена амидных групп с растворителем авторы работ [131, 132] предложили модель пространственной организации апамина, которая адекватно отражает основные конформационные особенности молекулы в растворе. Величины КССВ протонов $\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H}$ и $\text{H}-\text{C}^\alpha\text{C}^\beta-\text{H}$, ЯЭО между протонами и данные о доступности амидных групп для растворителя были успешно использованы при расшифровке пространственной структуры трансмембранного канала, образуемого грамицидином А [133]. Исследование пространственного строения ионного канала выполнено на моделях Кендрю, с помощью которых установлена конформация, удовлетворяющая данным ЯМР и приемлемая с геометрической точки зрения. Уточнение построенной в работе [133] модели проведено путем минимизации конформационной энергии [134, 135]. Следует отметить, что использованный авторами [133–135] подход к изучению пространственного строения ионного канала грамицидина А вполне оправдан, поскольку канал представляет собой димер, состоящий из двух правых одиночных $\pi_{LD}^{6,3}$ -спиралей, которые могут быть идентифицированы на основе наблюдаемой характерной для них периодичности ЯЭО-связей между протонами удаленных по аминокислотной последовательности остатков. Относительно небольшие размеры грамицидина А и в первую очередь регулярность его пространственной организации позволяют построить геометрическую модель молекулы без привлечения компьютерных средств (вручную с использованием моделей Кендрю). Однако в общем случае пространственная струк-

тура белков определяется большим числом параметров и поэтому моделирование третичной структуры таких сложных молекул может быть выполнено только с помощью компьютера.

1.2. Методы компьютерного моделирования пространственной структуры белков по данным спектроскопии ЯМР

1.2.1. Традиционные подходы

При решении задачи преобразования спектральных параметров ЯМР в координаты атомов широкое применение получили методы метрической матрицы. В случае, когда расстояния между всеми парами атомов известны с высокой точностью, они могут быть преобразованы в декартовы координаты с помощью следующего соотношения [136–142]:

$$G_{ij} = r_i r_j \quad (1.1)$$

где G_{ij} – матрица размером $N \times N$ с элементами, однозначно определяющими положения атомов в трехмерном пространстве; r_i и r_j – координаты атомов i и j .

Связь между расстояниями и координатами задается уравнением вида

$$G_{ij} = \sum \lambda_\alpha E_{i,\alpha} E_{j,\alpha} \quad (1.2)$$

Из анализа квадратичной формы метрической матрицы

$$\sum g_{ij} z_i z_j = (\sum z_i r_i)(\sum z_i r_i) \geq 0 \quad (1.3)$$

следует, что все ее собственные значения положительны (или равны нулю) и в большинстве случаев три из них отличны от нуля. Если квадратичная форма метрической матрицы равна нулю, получаем трехмерное векторное уравнение или три линейных уравнения с N переменными z_i :

$$\sum z_i r_i = 0, \quad (1.4)$$

т. е. существует по крайней мере $N-3$ линейных независимых решения.

Метрическая матрица может быть рассчитана непосредственно из расстояний

$$G_{ij} = \frac{1}{2} \sum D_{ij}^2 - 1/zN^2 \sum D_{jk}^2, \quad (1.5)$$

$$G_{ij} = \frac{1}{2} (G_{ii} + G_{jj} - D_{ij}^2). \quad (1.6)$$

Набор уравнений (1.1)–(1.6) описывает прямую взаимосвязь между расстояниями и координатами атомов. Подробное математическое описание этих уравнений приведено в работе Хавела и соавт. [141].

Методы метрической матрицы первоначально использовались в априорных расчетах пространственной структуры белков по их аминокислотной последовательности [136–142]. Позднее их основные алгоритмические приемы были реализованы в методе дистанционной геометрии DISGEO [143–149], получившем широкое практическое применение при решении задач моделирования пространственной структуры белковых молекул по данным спектроскопии ЯМР. С помощью этого метода осуществляется генерация декартовых координат атомов, удовлетворяющих ограничениям, которые налагаются ковалентной структурой молекулы и экспериментальными данными. В методе DISGEO учитываются два предела ограничений на расстояния между валентно не связанными атомами: нижний предел определяется ван-дер-ваальсовыми радиусами атомов, а верхний – данными о ЯЭО-связях. Программа DISGEO позволяет находить координаты N атомов $\{r_i = (x_i, y_i, z_i), i = 1, 2, \dots, N\}$, которые удовлетворяют неравенству вида

$$L_{ij} \leq |r_i - r_j| \leq U_{ij}, \quad (1.7)$$

где L_{ij} и U_{ij} – соответственно нижний и верхний пределы расстояния $|r_i - r_j|$ между центрами атомов i и j .

Для соблюдения экспериментальных и априорных ограничений, удовлетворяющих неравенству (1.7), программа минимизирует функцию ошибок:

$$F(r_i, \dots, r_N) = \sum' (|r_i - r_j|^2 - u_{ij}^2)^2 + \sum' (L_{kl}^2 - |r_k - r_l|^2)^2, \quad (1.8)$$

где Σ' указывает на то, что суммирование выполняется для членов, которые нарушают заданные уравнением (1.7) ограничения.

При этом для минимизации функции ошибок (1.8) координаты атомов, соответствующие начальному приближению, получают при помощи формализма метрической матрицы (см., например, [143]), которая определяется через выбранные случайным образом расстояния $|r_i - r_j|$, удовлетворяющие условию (1.7). Введение в дистанционный геометрический алгоритм элемента случайности связано с тем, что экспериментальные данные содержат информацию об ограниченном числе межатомных расстояний, заданных в относительно широком интервале неопределенности. Поэтому формирование матрицы расстояний, используемой для построения трехмерной структуры молекулы, осуществляется в три этапа (см., например, обзор Брауна [63]): 1) на основе анализа входных данных (расстояния ЯЭО; величины двугранных углов, оцененные из КССВ вицинальных протонов; ковалентная геометрия аминокислотных остатков; ван-дер-ваальсовы радиусы атомов) генерируется матрица верхних и нижних границ межатомных расстояний; 2) элементы, отсутствующие в этой матрице, оцениваются посредством анализа системы треугольных неравенств; 3) с помощью случайного выбора расстояний между верхними и нижними границами строится матрица, привлекаемая для расчета пространственной структуры молекулы. Следует отметить, что вследствие ошибок, введенных в результате случайного выбора начальных расстояний, расчетные структуры имеют значительное число нарушений заданной системы дистанционных ограничений [63].

Первая версия программы DISGEO позволяла находить координаты только 100–150 атомов, и по этой причине даже для небольших полипептидов использовалась модель псевдоатомного приближения [67, 144, 150], в которой каждый аминокислотный остаток (за исключением глицина) состоит из двух псевдоатомов α и β , моделирующих соответственно фрагмент $\text{NH}-\text{C}^\alpha\text{H}-\text{CO}$ и боковую цепь. Метод DISGEO в псевдоатомном приближении

был использован для установления пространственных структур инсектотоксина I₅A *Buthus eupeus* [67, 112, 113], нейротоксина M₉ *Buthus eupeus* [151], блеомицина [144], небольших фрагментов полипептидных цепей в липидсвязанном глюкогоне [143, 146], меллитине [145] и некоторых других белковых молекул [63]. В результате такого подхода возможно получение набора структур, удовлетворяющих заданным геометрическим ограничениям, но характеризующихся большим числом стерически запрещенных межатомных контактов (см., например, обзор Брауна [63]).

В работе [152] с целью привлечения информации о вицинальных константах H–NC^α–H и H–C^αC^β–H и скоростях дейтерообмена амидных протонов с растворителем разработано специальное дополнение к программе DISGEO, которое позволяет при построении пространственной структуры учитывать эти экспериментальные данные. Возможности предложенной методики продемонстрированы при расчете конформации спирального фрагмента Ala-13–Cys-20 инсектотоксина I₅A *Buthus eupeus* [152]. Анализ полученных результатов показал, что точность определения координат атомов при таком подходе несколько повышается. Для учета принципа плотной упаковки глобулярных белков, имеющих плотность, равную приблизительно 0,75 [103], в работе [67] к минимизируемой в DISGEO функции ошибок (1.8) добавлена составляющая

$$F(r_1, \dots, r_N, R_0) = [R^2(r_1, \dots, r_N) - R_0^2]^2, \quad (1.9)$$

где N – число псевдоатомов; $R(r_1, \dots, r_N)$ – радиус молекулы; R_0 – целевое значение радиуса молекулы [67].

Конформационный анализ инсектотоксина I₅A по данным ЯМР проведен с помощью алгоритма DISGEO с учетом плотной упаковки [67]. В результате получены координаты пятнадцати структур, для которых характерно низкое значение функции ошибок, свидетельствующее о том, что конформации удовлетворяют заданным ограничениям на расстояния.

Авторами работ [147, 148] предложена модификация программы DISGEO, позволяющая увеличить число рассматриваемых

мых в алгоритме центров и перейти от псевдоатомного к атомному описанию пространственной структуры белковых молекул, содержащих до 100 аминокислотных остатков. Возможности этой программной версии апробированы при реконструкции третичной структуры ПИТБ на основе модельных¹ параметров ЯМР [148]. Качество построенных структур, отвечающих десяти разным наборам исходных данных, проверено сопоставлением реконструированных конформаций с исходной кристаллографической конформацией [153]. При анализе структур использованы среднеквадратичные отклонения по координатам, дающие информацию о степени совпадения общей формы и размеров сравниваемых конформаций, а также среднеквадратичные отклонения по углам внутреннего вращения аминокислотных остатков для выявления их локального конформационного подобию. Расчеты, выполненные на основе модельных данных, показали, что алгоритм DISGEO дает возможность получать корректные пространственные укладки полипептидной цепи, однако конформационные состояния индивидуальных аминокислотных остатков воспроизводятся при этом неудовлетворительно. Тестирование программной версии DISGEO [147, 148] с использованием экспериментальных данных ЯМР выполнено в работе [149] в процессе построения модели пространственной структуры ингибитора протеаз BUSI IIА из плазмы семени быка.

Анализ структур, рассчитанных методом DISGEO, позволил выделить следующие его особенности [63, 154–156]: 1) пространственная укладка полипептидной цепи воспроизводится, как правило, корректно; 2) расчетные структуры образуют более вытянутую по сравнению с исходной рентгеновской конформацией пространственную форму; 3) структуры имеют достаточно большое число стерически напряженных межатомных контактов и вследствие этого неудовлетворительную локальную стереохимию; 4) компьютерные ресурсы, требуемые для проведения расчетов, быстро возрастают при увеличении размеров молеку-

¹ Здесь и далее для удобства изложения под термином «модельные» понимаются ожидаемые спектральные параметры ЯМР, которые могут быть оценены на основе анализа рентгеновских координат атомов молекулы.

лы и числа экспериментальных данных; 5) метод генерирует множество близких (с точки зрения пространственной укладки полипептидной цепи) структур вместо всех возможных конформаций, удовлетворяющих экспериментальным данным; 6) расчетные структуры характеризуются некорректными и неоднозначными конформациями.

Исправление указанных недостатков алгоритма DISGEO авторы работы [148] предполагают проводить на заключительном этапе уточнения структур с помощью процедур минимизации внутримолекулярной конформационной энергии. Другой путь разрешения проблемы возможен, по их мнению, только при значительном повышении точности измерения интенсивностей ЯЭО.

В работе [157] предложен отличный от DISGEO метод построения трехмерной структуры белковых молекул по данным о дистанционных ограничениях (метод DISMAN). Основопологающий элемент метода, использующего в качестве независимых переменных углы внутреннего вращения, состоит в последовательном переходе от пространственной укладки небольших фрагментов к укладке третичной структуры молекулы. Такая поэтапная сборка молекулярной модели достигается последовательной минимизацией методом наименьших квадратов набора целевых функций вида

$$\begin{aligned}
 T_{kl} = & \frac{1}{4} \sum \rho_k(\alpha, \beta) \theta(d_{\alpha\beta} - u_{\alpha\beta}) (d_{\alpha\beta}^2 - u_{\alpha\beta}^2)^2 / u_{\alpha\beta}^2 + \\
 & \frac{1}{4} \sum \sigma_k(\alpha, \beta) \theta(l_{\alpha\beta} - d_{\alpha\beta}) (l_{\alpha\beta}^2 - d_{\alpha\beta}^2)^2 / l_{\alpha\beta}^2 + \\
 & \frac{\omega}{4} \sum \tau_l(\alpha, \beta) \theta(S_\alpha + S_\beta - d_{\alpha\beta}) ((S_\alpha + S_\beta)^2 - d_{\alpha\beta}^2)^2,
 \end{aligned} \tag{1.10}$$

где $d_{\alpha\beta}$ – расстояние между атомами α и β ; $u_{\alpha\beta}$ и $l_{\alpha\beta}$ – соответственно верхняя и нижняя границы экспериментально заданных межатомных расстояний; S_α и S_β – ван-дер-ваальсовы радиусы атомов данной пары; ω – весовой множитель; θ – функция: $\theta(x) = 1$ при $x \geq 0$ и $\theta(x) = 0$ при $x < 0$; $\rho_k(\alpha, \beta) = 1$, если $(\alpha, \beta) \in u_k$,

и $\rho_k(\alpha, \beta) = 0$ в противном случае (аналогично определяются коэффициенты $\sigma_k(\alpha, \beta)$ и $\tau_k(\alpha, \beta)$).

Переменный индекс k , последовательно принимающий в процессе генерации структур значения 0, 1, 2, ..., задает размер рассматриваемого на данном шаге фрагмента. При этом суммирование проводится только для тех пар атомов (α, β), которые разделены вдоль валентной цепи не более чем k аминокислотными остатками.

Первые два члена целевой функции (1.10) определяют экспериментально заданные интервалы межпротонных расстояний, а третий введен с целью устранения возможных стерических перекрытий атомов. Стартовая модель имеет фиксированные длины связей, валентные углы и выбранные случайным образом наборы углов внутреннего вращения.

Как и в работе [148], тестирование программы выполнено с использованием модельных параметров ЯМР, установленных из данных кристаллографических исследований ПИТБ [153]. При построении структур для каждого из пяти рассмотренных авторами работы [157] наборов исходных данных генерировалось десять конформаций, различающихся между собой выбранным случайным образом начальным приближением. Анализ полученных на модельных расчетах результатов показал, что программа способна воспроизводить структуры с локальными конформациями, близкими к исходной рентгеновской структуре, при условии, если погрешность задания межатомных расстояний не превышает $\pm 0,1 \text{ \AA}$, т. е. только в том случае, когда точность определения дистанционных ограничений превосходит возможности метода спектроскопии ЯМР (см., например, [13, 158–160]).

Сравнительный анализ эффективности алгоритмов DISMAN и DISGEO, проведенный Вагнером и соавт. [161] на идентичных наборах данных, указывает на то, что программа DISMAN требует меньших затрат компьютерных ресурсов. Кроме того, с ее помощью может быть исследована большая часть потенциальной поверхности молекулы. Однако структуры, полученные обоими методами, имеют подобную стереохимию и близкое число нарушений экспериментальных данных.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Принятые сокращения	3
Введение	5

ЧАСТЬ 1

Конформационный анализ белков по данным спектроскопии ЯМР

Глава 1. Спектроскопия ЯМР и трехмерная структура белков. Теоретические аспекты проблемы	12
1.1. Основные этапы конформационного ЯМР-анализа белков	12
1.2. Методы компьютерного моделирования пространственной структуры белков по данным спектроскопии ЯМР	22
1.2.1. Традиционные подходы	22
1.2.2. Нетрадиционные подходы	43
1.3. Критический анализ методов	52
Глава 2. Метод определения локальной структуры белков на основе данных спектроскопии ЯМР. Вероятностный подход	66
2.1. Введение	66
2.1.1. Основные условные обозначения	66
2.1.2. Межпротонные расстояния и конформация белка	67
2.2. Диаграмма взаимосвязи межпротонных расстояний d с областями конформационного пространства (ϕ , ψ)	69
2.3. Определение двугранных углов ϕ , ψ аминокислотных остатков по данным спектроскопии ЯЭО	79
2.4. Уточнение конформаций остова аминокислотных остатков с учетом интенсивностей кросс-пиков ЯЭО	86
2.5. Спектральные параметры ЯМР регулярных вторичных структур и β -изгибов	90

2.6. Влияние конформеров χ_1 на величины двугранных углов ϕ, ψ .	96
2.7. Уточнение конформаций остова аминокислотных остатков с использованием КССВ ${}^3J_{\text{H-NC}\alpha\text{-H}}$	98
2.8. Аprobация вероятностного подхода. Компьютерные эксперименты	100
2.8.1. Модельные и реальные данные спектроскопии ЯМР . . .	100
2.8.2. Программа CONFNOE	102
2.8.3. Тестирование вероятностного подхода на модельных данных ЯЭО	102
2.8.4. Аprobация вероятностного подхода с использованием данных спектроскопии ЯМР	112
2.9. Конформационный ЯМР-анализ боковых цепей белков	120
2.9.1. Определение угла χ_1	121
2.9.2. Стерически разрешенные комбинации конформеров (χ_1, χ_2)	128
2.9.3. Исследование возможностей определения двугранных углов χ_1, χ_2 боковых цепей белков на основе данных спектроскопии ЯЭО	130
Глава 3. Локальная структура белков в растворе. Практическое применение вероятностного подхода	134
3.1. Введение	134
3.1.1. Постановка задачи	134
3.1.2. Компьютерные эксперименты	135
3.1.3. Сравнительный анализ конформаций	135
3.2. Локальная структура цитохрома <i>c</i> из сердца лошади в растворе	137
3.2.1. Цитохром <i>c</i> – «электронный челнок» дыхательной цепи	137
3.2.2. Результаты и их обсуждение	138
3.3. Конформация третьего домена овомукоиды индейки в растворе	163
3.3.1. Овомукоиды (общие сведения)	163
3.3.2. Результаты и их анализ	164
3.4. Конформационный анализ фрагмента 1–45 аденилаткиназы кролика на основе данных 2D спектроскопии ЯЭО	172
3.4.1. Фермент аденилаткиназа	172
3.4.2. Результаты и их обсуждение	173
3.5. Конформация глюкогона в липидном окружении согласно данным 2D спектроскопии ЯЭО	178
3.5.1. Полипептидный гормон глюкогон (общие сведения)	178
3.5.2. Результаты и их обсуждение	179
Глава 4. Метод расчета пространственной структуры белков по данным спектроскопии ЯМР	184
4.1. Введение	184
4.2. Общая характеристика метода	184

4.2.1. Стратегия и тактика компьютерных расчетов	184
4.2.2. Этапы установления пространственной структуры белковых молекул	190
4.2.3. Основные особенности метода и его отличия от других подходов	198
4.3. Тестирование метода. Компьютерные эксперименты	200
4.3.1. Моделирование пространственной структуры панкреатического полипептида птиц по модельным данным ЯЭО	200
4.3.2. Конформационный ЯМР-анализ ингибитора протеаз BUII ПА (трехмерная структура фрагмента 17–57)	207
4.3.3. Пространственная структура апамина в растворе	222
4.3.4. Тестирование метода другими авторами	234
4.3.5. Оценка возможностей метода и его преимущества перед другими подходами.	235
4.4. Ограничения метода и перспективы его развития	237
4.4.1. Модель «жесткой глобулы»	237
4.4.2. Эмпирическая база данных	238
4.4.3. Расширение базы данных и ее статистический анализ	239
4.4.4. Дополнительные данные спектроскопии ЯМР	240
4.4.5. Вероятностный подход и динамическая модель белка	241
4.4.6. Экстраполяция данных, отсутствующих в спектрах ЯЭО	241
4.4.7. Промежуточное спектроскопическое уточнение	242
Глава 5. Пространственная структура фрагмента Ala–Ser–Thr–Thr–Thr–Asn–Tyr–Thr белка gp120 ВИЧ, ответственного за связывание вируса с CD4-рецептором Т-клеток	244
5.1. Постановка задачи	244
5.2. Расчет пространственной структуры пептида Т	248
5.3. Расчет пространственной структуры ВКП' (4–11).	251
5.4. Результаты и их обсуждение	253
5.4.1. Пространственная структура пептида Т (4–8)	253
5.4.2. Пространственная структура пептида Т	257
5.4.3. Пространственная структура ВКП' (4–11)	264
5.4.4. Модель трехмерной структуры участка Ala–Ser–Thr–Thr–Thr–Asn–Tyr–Thr белка gp120 ВИЧ	266
Глава 6. Конформационный ЯМР-анализ основной антигенной детерминанты белка gp120 ВИЧ-1	273
6.1. Постановка задачи	273
6.2. Краткие сведения о пептидах-фрагментах ОАД ВИЧ-1.	274
6.3. Структурный ЯМР-анализ лабильных фрагментов белков. Новый подход к решению проблемы	275
6.4. Компьютерные эксперименты	283

6.4.1. Расчет трехмерной структуры пептидов gp70, gp142 gp342	283
6.4.2. Конформационный анализ гексапептида Gly-Pro-Gly-Arg-Ala-Phe и его N-концевого тетрапептида	286
6.5. Результаты компьютерных экспериментов	286
6.5.1. Модель трехмерной структуры ОАД ВИЧ-1 (пептид gp70)	286
6.5.2. Пептид gp142	295
6.5.3. Пептид gp342	298
6.5.4. Гексапептид Gly-Pro-Gly-Arg-Ala-Phe и его N-концевой тетрапептид	303
6.6. Модель трехмерной структуры иммунодоминантного эпитопа ВИЧ-1	314

ЧАСТЬ 2

Предсказание структуры белков и компьютерное конструирование лекарств

Глава 7. Методы молекулярного моделирования	328
7.1. Введение	328
7.2. <i>Ab initio</i> фолдинг белков	333
7.3. Сопоставительное моделирование	337
7.4. Молекулярная динамика белков	344
7.5. Молекулярный докинг	351
7.6. Современные подходы к созданию новых лекарственных препаратов	362
7.6.1. Основные понятия	362
7.6.2. Поиск мишени	363
7.6.3. Поиск действующего вещества	364
7.6.4. Комбинаторная химия и высокопроизводительный скрининг	366
7.6.5. Фармакологический цикл	367
7.6.6. Клинические исследования	368
7.6.7. Компьютерное конструирование лекарств	369
Глава 8. Структурный анализ третьего переменного домена белка gp120 оболочки ВИЧ-1 – перспективной мишени для создания новых противовирусных препаратов	382
8.1. Введение	382
8.2. Структурный анализ консенсусных последовательностей петли V3 ВИЧ-1 подтипов А, В, С и D	384
8.3. Структурный анализ петли V3 белка gp120 ВИЧ-1 для вариантов вируса, циркулирующих в странах Восточной Европы	398

Глава 9. Компьютерное конструирование потенциальных лекарственных препаратов для терапии СПИДа	417
9.1. Иммунофилины и петля V3 белка gp120 ВИЧ-1	417
9.1.1. Введение	417
9.1.2. Молекулярный докинг петли V3 с иммунофилинами . . .	419
9.1.3. Компьютерный дизайн FKBP-пептида – потенциального ингибитора репликации ВИЧ-1	420
9.1.4. Компьютерное конструирование циклофилин-А пептида	427
9.1.5. Компьютерное моделирование циклофилин-В пептида .	432
9.2. Гликофинголипиды и петля V3 ВИЧ-1	441
9.2.1. Расчет трехмерных структур β -GalCer и его аналогов . .	444
9.2.2. Исследование динамических свойств β -GalCer и его аналогов	446
9.2.3. Моделирование трехмерных структур пептидов петли V3 ВИЧ-1	448
9.2.4. Построение структурных комплексов	448
9.2.5. Анализ структурных комплексов гликолипидов с пептидами петли V3 белка gp120 ВИЧ-1	450
9.2.6. Анализ энергии специфических взаимодействий гликолипидов с петлей V3 ВИЧ-1	454
9.2.7. Первичные медицинские испытания производного β -GalCer	464
Заключение	466
Литература	468
Дополнительная литература к ч. 1	507
Дополнительная литература к ч. 2	509

Научное издание

Анрианов Александр Михайлович

**КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ.
ТЕОРИЯ И ПРИЛОЖЕНИЯ**

Редактор *Г. В. Малахова*

Художественный редактор *И. Т. Мохнач*

Технический редактор *О. А. Толстая*

Компьютерная верстка *Н. И. Кашуба*

Подписано в печать 26.02.2013. Формат 60 × 84 ¹/₁₆. Усл. печ. л. 30,11+0,7 вкл.

Уч.-изд. л. 27,8. Тираж 120 экз. Заказ 47.

Издатель и полиграфическое исполнение:

Республиканское унитарное предприятие «Издательский дом
«Беларуская навука». ЛИ № 02330/0494405 от 27.03.2009.

Ул. Ф. Скорины, 40, 220141, г. Минск.