

3. *Karplus M.* Dynamics of proteins // Proc. 2th SUNYA conversation in the discipl. biomol. stereodynamics.— New York: Adenine press, 1982.— Vol. 2.— P. 211—228.
4. *Абатуров Л. В.* Тепловые движения белка: мелкомасштабные флуктуации и конформационные подсостояния // Молекуляр. биология.— 1983.— 17, № 4.— С. 683—704.
5. *Абатуров Л. В., Лебедев Ю. О., Носова Н. Г.* Динамическая структура глобулярных белков: конформационная жесткость и флуктуационная подвижность // Там же.— № 3.— С. 543—567.
6. *Гривцов А. Г., Маленков Г. Г., Абатуров Л. В.* Численное моделирование молекулярной динамики белков // Там же.— С. 587—615.
7. *Равновесная динамика структуры биополимеров / Л. В. Абатуров, Э. А. Бурштейн, В. И. Иванов и др.* // Там же.— С. 451—454.
8. *An approach to the mapping of internal motions in protein analysis of ¹³C relaxation in the bovine pancreatic trypsin inhibitor / A. A. Ribeiro, K. King, Ch. Restivo, O. Jardetzky* // J. Amer. Chem. Soc.— 1980.— 102, N 12.— P. 4040—4051.
9. *Lipari G., Szabo A.* Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules 1. Theory and range of validity // Ibid.— 1982.— 104, N 17.— P. 4546—4559.
10. *Lipari G., Szabo A.* Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 2. Analysis of experimental results // Ibid.— P. 4559—4770.
11. *Федотов В. Д.* Импульсный ЯМР в блочных полимерах: Дис... докт. физ.-мат. наук: 01.04.15.— Защищена 03.06.81; Утв. 17.04.82.— Казань, 1981.— 273 с.— Библиогр.: с. 254—273.
12. *Федотов В. Д., Киваева Л. С.* Характеристики и механизмы внутримолекулярного движения в глобулярных белках по данным магнитной релаксации ядер ¹³C // Физ.-хим. свойства биополимеров в растворе и клетках (23—26 сент. 1985 г., Пушкино).— Пушкино, 1985.— С. 106.
13. *Fedotov V. D.* NMR relaxation and molecular dynamics in polymers and biopolymers // Progress in polymer spectroscopy: Proc. 7th Eur. symp. on polymer spectroscopy (15—18 Oct. 1985, Leipzig).— Leipzig, 1986.— P. 262—271.
14. *Fuoss R., Kirkwood J. G.* Electrical properties of solids // J. Amer. Chem. Soc.— 1941.— 63, N 2.— P. 385—394.
15. *Чернов В. М., Федотов В. Д.* Ядерная магнитная релаксация и природа распределения времен корреляции сегментального движения в каучуках // Высокомолекуляр. соединения.— 1981.— 23А, № 4.— С. 932—942.
16. *Kaplan J. J., Garroway A. N.* Homogeneous and inhomogeneous distributions of correlation times. Line shapes for chemical exchange // J. Magn. Reson.— 1982.— 49, N 3.— P. 464—475.
17. *Lipari G., Szabo A., Levy R. M.* Protein dynamics and NMR relaxation: comparison of simulations with experiment // Nature.— 1982.— 300, N 5880.— P. 197—198.
18. *Khazanovich T. N., Mironov V. D.* NMR line shape and spin-locking in slowly tumbling methyl groups // Mol. Phys.— 1985.— 55, N 1.— P. 145—159.
19. *Woessner D. E.* Spin relaxation processes in a two-proton system undergoing anisotropic reorientation // J. Chem. Phys.— 1962.— 36, N 1.— P. 1—4.
20. *Glarum S. H.* Dielectric relaxation of isoamyl bromide // Ibid.— 1960.— 33, N 3.— P. 639—643.
21. *Voigt G., Kimmich R.* Chain fluctuation in the amorphous region of polyethylene as indicated in proton relaxation spectroscopy // Polymers.— 1980.— 21, N 2.— P. 1001—1008.
22. *Cole K. S., Cole R. H.* Dispersion and absorption in dielectrics. 1. Alternating current characteristics // J. Chem. Phys.— 1941.— 9, N 4.— P. 341—351.
23. *Davidson V. C., Cole R. H.* Dielectric relaxation in glycerole propylene glycol and n-propanol // J. Chem. Phys.— 1951.— 19, N 12.— P. 1484—1490.

Ин-т биологии Казан. фил. АН СССР

Получено 21.04.86

УДК 547.962

АНАЛИЗ ДАННЫХ ПО МАГНИТНОЙ РЕЛАКСАЦИИ ЯДЕР ¹³C В ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКАХ

В. Д. Федотов, Л. С. Киваева

Введение. В данной работе для анализа релаксационных данных ¹³C-ЯМР высокого разрешения в глобулярных белках используется подход, изложенный в работе [1].

В настоящее время спектры высокого разрешения, пригодные для проведения корректных измерений ядерной релаксации отдельных линий, могут быть получены только для белков небольшого размера. Лучшей моделью для такого рода экспериментов является бычий пан-

кратический ингибитор трипсина (ПИТ, молекулярная масса 6500). В спектрах ^{13}C -ЯМР этого белка разрешено [2] около 30 резонансных линий, соотносенных с различными положениями протонированных углеродов на полипептидном остове и в боковых цепях. Для каждой линии измерены по шесть независимых релаксационных параметров. Этот уникальный эксперимент по объему и детальности превосходит все известные до сих пор исследования динамики белков и предоставляет богатейший материал для анализа механизмов и характеристик внутримолекулярных движений.

Данные этого эксперимента анализировали с помощью различных модификаций формального подхода [2—5], но при этом не было достигнуто их адекватного описания. Подход авторов эксперимента подвергся критике [3—5], поскольку результаты его применения, математически точно описывающие экспериментальные данные, сложно интерпретировать в терминах молекулярных движений. Вторая модификация формального подхода, являясь шагом вперед по сравнению с предыдущей, смогла объяснить только часть экспериментальных данных. В настоящей работе анализ этого эксперимента проводится в рамках теории, развитой для анализа ^1H -ЯМР релаксации в твердых полимерах [6]. Согласно данному подходу, внутримолекулярные движения в белках, так же как и в любых других твердых полимерах, анизотропны и характеризуются неэкспоненциальными функциями корреляции [1].

Анализ релаксационных данных. Объекты.

1. ПИТ (9,8 мМ в D_2O , pH 5,0, 50 мМ NaCl, 17 °C), данные работы [2]: T_1 , T_2 , ЯЭО измерены на частотах 45 и 90 МГц для 33 резонансных линий, соотносенных с метиновыми, метиленовыми и метильными углеродами различных аминокислотных остатков.

2. Панкреатическая рибонуклеаза S, содержащая обогащенный ядрами ^{13}C N-концевой пептид (5 %-ный раствор в 15 %-ной D_2O , pH 6,5, 0,1 М NaCl, 20—27 °C), данные работы [7]: T_1 , ЯЭО измерены для трех резонансных линий на частотах 25, 68, 100 и 125 МГц.

Выбор данных белков обусловлен их достаточной изученностью, а также получением для них наибольшего набора экспериментальных параметров релаксации.

Процедура согласования экспериментальных данных. Микродинамические параметры определяли, решая систему трансцендентных уравнений (9—11) [1], полученную при объединении всех экспериментальных данных для анализируемой углеводородной группы. Решение получали с помощью программы минимизации функции, работающей по методу деформированных многогранников [8]. Поскольку данная задача относится к классу некорректных, мы специально проанализировали вопрос о степени неоднозначности ее решения. С этой целью рассчитали T_1 , T_2 , ЯЭО по уравнениям (9—11) [1] для широкого диапазона микродинамических параметров и решили обратную задачу: определяли наборы подгоночных параметров τ_R , q^2 , τ_i , δ , описывающие рассчитанные T_1 , T_2 , ЯЭО с заданной точностью. Результаты показали, что 1) при погрешности T_1 , T_2 , ЯЭО менее 1 % подгоночные параметры с точностью 1—2 % соответствуют предварительно заданным, а при погрешности релаксационных данных 10—20 % точность воспроизведения параметров τ_R , q^2 , τ_i , δ снижается до 20—30 %; 2) введение в расчеты времени спин-спиновой релаксации или использование для согласования более четырех релаксационных параметров повышает однозначность определения микродинамических параметров. Но при этом все же возможны небольшие взаимокompенсирующие вариации их пар — q^2 и τ_R , τ_i и δ .

При согласовании экспериментальных данных из всех вариантов подгонки выбрали тот, что наиболее точно описывал частотную зависимость времени спин-решеточной релаксации. Кроме того, на величину τ_R накладывали условие: время корреляции общего движения должно быть одинаковым для всех групп одной и той же макромолекулы и не превышать теоретического значения, рассчитанного по формуле Дебая, более чем в 2—3 раза [9].

С помощью подгонки четырех микродинамических параметров мы согласовали в пределах ошибки эксперимента все данные для $\alpha\text{-CH}$, CH_2 , CH_3 и ароматических CH -групп.

Таблица 1

Микродинамические параметры метильных групп ПИТ, рассчитанные с использованием трех модификаций
The microdynamical parameters of PTI methyl groups, calculated by means of three modifications

Параметр	Остаток аминокислоты, поло						
	5 РНКазы	16	25	β-Ала		48	58
				27	40		
τ_1 , нс							
[1]	220	25	60	25	42	39	25
[2] 45 МГц	—	50	100	50	50	50	50
[2] 90 МГц	—	50	50	50	50	50	50
[3, 4]	35*	55	38	70	55	40	37
q^2							
[1]	1	1	1	1	1	0,996	1
[2] 45 МГц	—	0,94	0,98	0,97	0,94	0,79	0,97
[2] 90 МГц	—	0,92	0,92	0,87	0,92	0,87	0,87
[3, 4]	0,92*	0,96	0,94	0,97	0,96	0,95	0,99
δ [1]	0,43	0,62	0,66	0,62	0,62	0,62	0,63
σ , % [1]	8***	11	7	11	5	18	11

Примечание. σ —среднеквадратичное отклонение рассчитанных T_1 , T_2 , ЯЭО от эксперимента
 ***—отклонение для одного из параметров ЯЭО больше 30 %.

Отметим, что в работе [2] для каждой углеводородной группы согласованы между собой только наборы из трех релаксационных параметров (для каждой частоты отдельно). И наборы подгоночных параметров, полученных для одной и той же линии, в ряде случаев значительно различаются. Кроме того, для согласования экспериментальных данных авторы вынуждены были ввести в рассмотрение движение, более медленное, чем броуновское вращение макромолекулы, которое, согласно принятому формальному подходу, не должно вносить вклада в релаксацию в виде отдельной моды движения.

Подход, развитый в работах [3, 4], не позволяет полностью согласовать все шесть параметров (T_1 , T_2 , ЯЭО на двух частотах — ПИТ). Так, при хорошем согласовании величин T_1 , ЯЭО значения расчетных T_2 в два раза превышают экспериментальные. Для РНКазы неполное согласование данных (T_1 , ЯЭО на четырех частотах) достигнуто при подгоночном τ_R (20 нс), намного превышающем теоретическое значение (3 нс [5]).

Результаты и обсуждение. Введение еще одного параметра для описания локальных движений позволило лучше согласовать экспериментальные данные и более правильно определить параметры q^2 и τ_1 .

Полученные в рамках нашего подхода микродинамические параметры различных углеводородных групп приведены в табл. 1 и 2. Отметим их основные особенности.

1. Времена корреляции локальных движений α -углеродов основной цепи и ближайших к ней групп составляют сотни пикосекунд, тогда как для углеродов боковых цепей τ_1 уменьшаются до десятков и единиц пикосекунд.

2. Параметр анизотропии q^2 увеличивается от 0,2 до 1 в ряду

$$q_{\alpha\text{-СН}}^2 < q_{\text{аромат. СН}}^2 < q_{\beta\text{-СН}_2}^2 < q_{\gamma\text{-СН}_2}^2 < q_{\delta\text{-СН}_2}^2 \approx q_{\text{СН}_3}^2.$$

3. Параметр ширины распределения времен корреляции, δ , для всех групп заметно меньше единицы и увеличивается от 0,4 до 0,65 в ряду

$$\delta_{\text{аромат. СН}} < \delta_{\alpha\text{-СН}} < \delta_{\text{СН}_3} \approx \delta_{\text{СН}_2}.$$

4. Величины q^2 и δ СН_3 -групп ПИТ не зависят от длины боковой цепи до концевой метильной группы, тогда как для величин τ_1 наблюдается корреляция с положением СН_3 -группы на боковой цепи. Аномально большое τ_1 найдено для $\beta\text{-СН}_3$ Ала-5 РНКазы.

жение остатка и СН₃-группы

γ-			δ-				в-Мет-52
Иле	Тре-11, Вал	Тре-32, 54	Вал, Лей, Иле	Лей-29, Иле-18, 19	Иле-18, 19	Лей-6	
31	45	44	30	15	26	27	13
50	50	50	50	14	10	25	22
50	50	50	30	3,3	3,3	5,1	14,3
43	—	—	—	20	20	25	23
1	1	0,97	1	0,98	0,993	0,998	1
0,94	0,92	0,92	0,89	0,92	0,83	0,92	0,92
0,91	0,88	0,88	0,87	0,92	0,83	0,95	0,85
0,97	—	—	—	0,98	0,99	0,978	0,98
0,62	0,62	0,66	0,60	0,60	0,64	0,67	0,57
4	10	8	25**	16	7	12	18***

льных; *—расчеты работы [15]; **—отклонение для одного из параметров T_1 больше 20 %;

Следует подчеркнуть основное отличие наших результатов от результатов предыдущих обработок данных: ни для одного типа групп не получено значений $\delta \sim 1$, несмотря на многочисленные варианты подгонки без введения каких-либо ограничений на величину δ (кроме $0 \leq \delta \leq 1$).

Для более детального рассмотрения полученных результатов и выяснения их связи со структурно-динамическими характеристиками белков необходимо перейти от формальных параметров, характеризующих сложное эффективное движение (q^2 , τ_i , δ), к микродинамическим характеристикам составляющих его движений. Для этого следует сложное движение разложить на более простые и описать последние количественно с использованием модельных представлений.

Движение метильных и метиленовых групп. В таблицах результаты нашей обработки данных для углеродов метильных групп сопоставляются с результатами, полученными с помощью других подходов. Различия между ними определяются описанием внутримолекулярных движений: в работах [2—4] вводится единственное время корреляции, мы же рассматриваем спектр времен. Все способы обработки данных приводят к достаточно близким, непротиворечивым результатам. Величины τ_i имеют порядок десятков пикосекунд и обнаруживают тенденцию к уменьшению при удлинении боковой цепи. Величины параметра анизотропии для трех способов расчета различаются на 5—10 %.

Данные по ЯМР углеродов метильных групп неоднократно обсуждались в рамках модели вращательно-колебательных движений [10, 11]. Признано, что движение концевых СН₃-групп можно рассматривать как суперпозицию движений двух типов: вращения СН₃-группы вокруг оси симметрии (непрерывного или скачкообразного) и колебательных движений этой оси.

Параметр анизотропии для случая независимых движений с сильно различающимися скоростями можно разделить на отдельные вклады. В первом приближении

$$q^2 = 1 - (1 - q_{OC}^2)(1 - q_{СН_3}^2). \quad (1)$$

Здесь $q_{СН_3}^2$ и q_{OC}^2 — параметры анизотропии движения СН₃-группы вокруг оси симметрии и движений этой оси соответственно. Вращению вектора СН

под углом $\sim 70^\circ$ к фиксированной оси [12] отвечает величина $q_{\text{CH}_2}^2 \sim 0,89$ (см. уравнение (17) в [1]). Наличие второго движения, даже весьма ограниченного, $q_{\text{OC}}^2 \sim 0,4 - 0,6$, приводит к величинам $q^2 \sim 0,94 \div 0,96$, что при нашей процедуре подгонки неотличимо от 1.

Так как параметр анизотропии метильных групп с достаточно высокой точностью равен 1, то их внутримолекулярное движение на пикосекундной шкале времен можно рассматривать как практически изотропное.

Таблица 2

Микродинамические параметры протонированных углеродов ПИТ: результаты обработки экспериментальных данных [2] с использованием уравнений (8—11) работы [1]

The microdynamical parameters of PTI protonated carbons: the results of the experimental data treatment by the equations (8—11)

Параметр	α -CH					CH ₂				
	Остаток									
	Неизвестен	Неизвестен	Неизвестен	Ала-58	Ала-5 РНК-азы	β -Асп-3,50	β -Асп-3,50	γ -Глу-7,49	ϵ -Лиз	ϵ -Лиз РНК-азы
	Химический сдвиг, м. д.									
	51,14	52,13	53,55	51,74	—	36,80	36,50	33,29	39,36	—
$\tau_{R, \text{нс}}$	3	2	2	3	9	2	1,7	2	2	3
τ_l	110	250	200	195	300	196	150	40	22	45
q^2	29	28	28	50	20	68	65	70	99	90
δ	50	50	55	60	50	60	60	60	53	67
$\sigma, \%$	13 ²	9	16	13	20 ³	15	8	25 ¹	10 ¹	3

Параметр	Остаток, положение СН-групп											
	Фен/Тир (2, 6)						Тир (3, 5)					
	Химический сдвиг, м. д.											
		128,1	128,51	128,9	130,0	130,41	131,27	131,56	135,25	115,99	116,87	117,2
$\tau_{R, \text{нс}}$	2	3	3	3	3	2	2	2	3	2,9	3	2,9
τ_l	30	70	52	80	82	25	50	83	50	20	50	117
q^2	42	68	36	33	44	32	48	44	60	40	55	48
δ	43	47	44	40	44	39	43	43	42	42	42	39
$\sigma, \%$	20	15 ³	11	9	10	12	14	16 ¹	17 ^{2,3}	18	7	9

Примечание. 1— $\sigma \tau_1 \geq 20 \%$; 2— $\sigma \tau_2 \geq 20 \%$; 3— $\sigma_{\text{язо}} \geq 30 \%$.

Зависимость эффективного времени корреляции τ_l от положения метильной группы на боковой цепи свидетельствует о том, что в переориентацию метильной группы существенный вклад вносят колебательные движения всех связей боковой цепи.

Аналогичные заключения можно сделать о динамике метиленовых групп, достаточно удаленных от остова, совершающих практически изотропное движение, $q^2 \approx 1$ (ϵ -CH₂ Лиз ПИТ): механизм движения лишь в деталях отличается от такового для метильных групп — возможны полные повороты CH₂-групп вокруг связи С—С или О—С (CH₂-Лиз).

Малые значения фактора анизотропии β - и γ -CH₂-групп ($q^2 \sim 0,7$) свидетельствуют об анизотропности их движений. Скорее всего, для них маловероятны полные провороты вокруг связей С—С, а возможны лишь ограниченные колебательные движения.

Интересно отметить, что время корреляции β -СН₃ Ала-5 РНКазы в несколько раз превышает времена корреляции β -СН₃ всех Ала ПИТ. Возможно, это связано с тем, что в ингибиторе трипсина все остатки Ала находятся в областях с неупорядоченной конформацией остова [13], тогда как остаток Ала-5 РНКазы S расположен на участке с α -спиральной структурой [14]. Можно полагать, что движение С _{α} —С _{β} связи Ала-5 РНКазы сильно заторможено по сравнению с таковым в областях с неупорядоченной структурой.

Не исключено, что для заторможенных групп (β -СН₃ Ала-5 РНКазы, β -СН₂ Асп ПИТ), расположенных близко к полипептидному остову, происходит смена механизма релаксации (см. обсуждение результатов для α -углеродов).

Движение ароматических колец. Движение СН-групп фенильных колец остатков Тир и Фен ПИТ характеризуется широким распределением времен корреляции ($\delta \sim 0,4$) и параметрами q^2 и τ_1 , достаточно сильно меняющимися от линии к линии (табл. 2).

Из-за отсутствия соотношения линий ароматической части спектра мы не можем проанализировать микродинамические параметры q^2 , τ_1 достаточно детально. Но можно надеяться, что в будущем при идентификации сигналов данные табл. 2 дадут дополнительную информацию о внутримолекулярном движении ароматических колец.

Микродинамические параметры ароматических СН-групп (малые $q^2 \sim 0,4$, большие скорости, $\tau_1 \sim 50$ пс) характеризуют, вероятно, стохастические крутильные колебания колец на ограниченный угол около положения равновесия [11, 15]. Эти движения можно описать моделью стохастических колебаний в пределах конуса [16] и оценить в рамках этой модели величины углов, ограничивающих движение. Согласно уравнению (16) работы [1] величине $q^2 \sim 0,45$ соответствует угол $\Theta \sim 35^\circ$.

В численных экспериментах по имитации равновесной динамики ароматических колец (Тир-21 ПИТ) обнаружено [17], что отклонение ориентации плоскости кольца от равновесного положения (изменение двугранного угла χ) на пикосекундной шкале времен не превышает 30° . Сопоставляя величины $\Delta\chi$ с величинами оцененных нами углов Θ ($\Theta > \Delta\chi_{\text{макс}}$), можно предположить, что, хотя эффективный угол Θ определяется в основном крутильными колебаниями кольца, в него вносят вклад и другие движения, например, колебания связей боковой цепи, движения остова и пр.

Все это дает основание предположить, что эффективное движение ароматических колец представляет собой суперпозицию затухающих крутильных колебаний с широким спектром частот.

Как показано численными экспериментами по молекулярной динамике [15], на пикосекундной шкале времен движение ароматических колец может быть описано почти экспоненциальной функцией корреляции. Если предположить, что остальные моды колебаний колец также характеризуются функциями корреляции, несущественно отличающимися от экспоненциальных, то можно заключить, что наблюдающееся в эксперименте широкое распределение времен корреляции имеет главным образом неоднородную природу.

Неоднородное распределение времен корреляции колебательных движений колец в интерьере белка может быть вызвано прежде всего, как мы полагаем, низкочастотными (ω_0^{-1}) флуктуациями микроокружений, не усредненными за время наблюдения, или, другими словами, динамической неоднородностью микроокружений.

Движение углеродов полипептидного остова. Движения α -углеродов ПИТ и РНКазы характеризуются малыми величинами q^2 , свидетельствующими о значительной ограниченности движений, большими τ_1 (порядка сотен пикосекунд), довольно широкими спектрами времен корреляции. Своеобразным исключением является α -СН-группа Ала-58 ПИТ (С-концевого остатка): ее параметр q^2 заметно выше, чем у остальных, а ширина спектра заметно уже и при-

ближается к таковой для CH_2 - и CH_3 -групп. Это коррелирует с повышенной гибкостью остова на С-конце макромолекулы, что следует из рентгеноструктурного анализа [13] и работ по молекулярной динамике [18].

В принципе микродинамические характеристики α -углеродов можно интерпретировать в рамках модели стохастических колебаний на ограниченный угол с учетом распределения времен корреляции. Но принимая во внимание, что время корреляции движений составляет сотни пикосекунд, а параметр ширины распределений $\delta \sim 0,5$, можно предположить [1], что релаксация α -углеродов происходит по механизму диф-

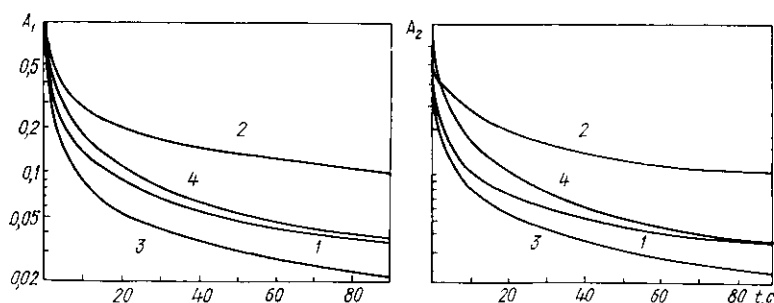


Рис. 1. Спады продольной (A_1) и поперечной (A_2) намагниченностей в случае неоднородного распределения времен корреляции внутримолекулярного движения: $\tau_R = \infty$; $\omega = 2\pi \cdot 60$ МГц; 1 — α -СН ($q^2 = 0,3$, $\tau_i = 200$ пс, $\delta = 0,5$); 2 — ароматические СН ($q^2 = 0,4$, $\tau_i = 50$ пс, $\delta = 0,4$); 3, 4 — CH_3 ($q^2 = 1$, $\delta = 0,6$, $\tau_i = 50$ и 20 пс)

Fig. 1. The longitudinal (A_1) and transversal (A_2) magnetization decays in the case of heterogeneous distributions of internal motion correlation times: $\tau_R = \infty$; $\omega = 2\pi \cdot 60$ MHz; 1 — α -CH ($q^2 = 0,3$, $\tau_i = 200$ ps, $\delta = 0,5$); 2 — aromatic CH ($q^2 = 0,4$, $\tau_i = 50$ ps, $\delta = 0,4$); 3, 4 — CH_3 ($q^2 = 1$, $\delta = 0,6$, $\tau_i = 50$ and 20 ps)

фузии дефектов, аналогично тому, что имеет место в кристаллических областях полиэтилена при температурах, близких к температуре плавления [6].

Физически картина может быть следующей. Среди множества СН-групп полипептидного остова имеются такие метиновые группы, которые по ряду причин, например из-за изгибов цепи или дефектов упаковки, могут совершать колебательные движения большей амплитуды, чем остальные. Эти группы, находящиеся в «возбужденном состоянии», представляют собой «дефекты». Они могут возникать практически в любом месте цепи, т. е. практически любая СН-группа может перейти в состояние дефекта. Релаксация всех метиновых групп остова осуществляется благодаря миграции возбужденного состояния вдоль цепи. Возможны две ситуации: 1) дефекты с равной вероятностью появляются в любом месте цепи и 2) вероятность возникновения дефекта зависит от наличия на данном участке другого дефекта. Обе ситуации — дефекты возникают поодиночке или же группами, кооперативно — идентичным образом проявляются в эксперименте.

В белках эффективным механизмом переориентации СН-групп остова могут быть кооперативные изменения ориентации небольших участков остова, включающих несколько ковалентных связей, такие как, например, синхронные изменения двугранных углов Ψ_{38} и Φ_{39} ПИТ, обнаруженные в численных экспериментах по имитации молекулярной динамики [19].

В случае релаксации углеродов остова по механизму диффузии дефектов параметры τ_i и δ описывают однородное распределение времен корреляции (см. [1]), а параметр q^2 определяется амплитудой колебаний атомов в состоянии дефекта и концентрацией дефектов:

$$q^2 = q_d^2 \cdot N_d/N. \quad (2)$$

Здесь q_d^2 — параметр анизотропии движений дефекта; N_d/N — концентрация дефектов.

О распределении времен корреляции в белках. Как установлено выше, внутримолекулярные движения в белках характеризуются довольно широкими распределениями времен корреляции. Рассчитанные по уравнению (5) работы [1] формальные спектры охватывают области времен от 10^{-15} до 10^{-6} с, хотя вклады наиболее низких и наиболее высоких частот невелики (см. рис. 1, а [1]).

Появление в спектре последних следует рассматривать как артефакт, связанный с неточностью описания спектра симметричной функцией Фуосса — Кирквуда. Внутренние движения в белках описываются, по-видимому, более сложным, асимметричным, распределением времен

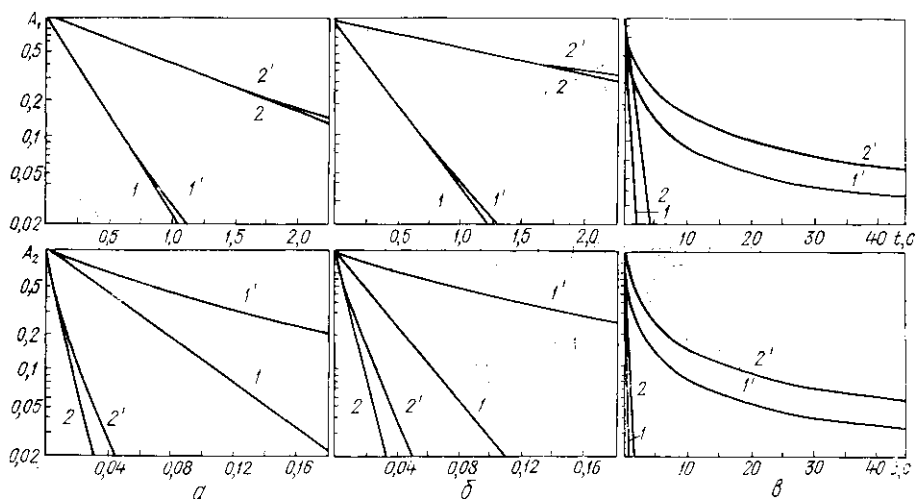


Рис. 2. Спады продольной (A_1) и поперечной (A_2) намагниченностей для случаев однородного (1, 2) и неоднородного (1', 2') распределений времен корреляции: а — α -СН ($q^2=0,3$, $\tau_i=200$ пс, $\delta=0,5$); б — ароматические СН ($q^2=0,4$, $\tau_i=50$ пс, $\delta=0,4$); $\tau_R=2$ (1) и 30 пс (2); в — CH_3 ($q^2=1$, $\delta=0,6$, $\tau_i=50$ (1) и 20 пс (2))

Fig. 2. The longitudinal (A_1) and transversal (A_2) magnetization decays in the cases of homogeneous (1, 2) and heterogeneous (1', 2') distributions of correlation times: а — α -СН ($q^2=0,3$, $\tau_i=200$ ps, $\delta=0,5$); б — aromatic СН ($q^2=0,4$, $\tau_i=50$ ps, $\delta=0,4$); $\tau_R=2$ (1) and 30 ns (2); в — CH_3 ($q^2=1$, $\delta=0,6$, $\tau_i=50$ ps (1) and 20 ps (2))

корреляции. Переход от формального спектра к реальному возможен при рассмотрении конкретных моделей движения. В настоящее время мы ограничиваемся качественным анализом распределений, полагая, что величины δ пропорциональны истинной ширине распределений.

В данной работе получена информация о форме спектров времен корреляции. Но этого недостаточно для однозначного выбора модели движения. Возможно, решению этой проблемы будет способствовать установление природы распределений времен корреляции.

Как уже отмечалось [1], метод ЯМР предоставляет возможность различить случаи однородного и неоднородного распределений непосредственно в эксперименте. Чтобы установить такую возможность в экспериментах по ЯМР белков и найти для этого оптимальные условия, мы провели расчеты продольной и поперечной ядерных намагниченностей по уравнениям (12, 13) работы [1] в широком диапазоне времен, частот и температур для типичных значений q^2 , τ_i , δ протонированных углеродов ПИТ. При этом величину τ_R варьировали в диапазоне 1—30 нс, моделируя тем самым эксперименты с белками различных молекулярных масс. Часть результатов представлена на рис. 1—3.

Расчеты показали, что в случае неоднородного распределения времен корреляции поведение продольной и поперечной намагниченностей должно отличаться от экспоненциального. Эффект более выражен для поперечной намагниченности и зависит от величин q^2 , τ_R , ω . Даже для $q^2 \sim 0,3-0,4$ (α -углероды, углероды ароматических колец) найдены за-

метные отличия $A(t)$ от экспоненты, наибольшие — на частотах 60—120 МГц для белков малых размеров ($\tau_R \sim 1$ —2 нс). Величина отклонения зависит от величины $\omega\tau_R$, и для белков любых размеров можно в принципе определить оптимальный диапазон частот для наблюдения $A(t)$.

Поскольку ожидаемый эффект невелик, для окончательного выбора моделей движения различных групп в белках необходимо поставить, как мы полагаем, специальный эксперимент (на небольших белках)

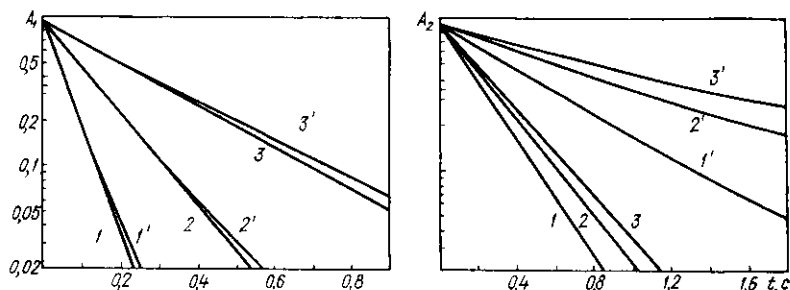


Рис. 3. Зависимости продольной (A_1) и поперечной (A_2) намагниченностей от частоты (1—20 МГц; 2—60 МГц; 3—120 МГц) для случаев однородного (1, 2, 3) и неоднородного (1', 2', 3') распределений времен корреляции ($q^2=0.4$, $\tau_R=2$ нс, $\tau_i=50$ пс, $\delta=0.4$)

Fig. 3. The longitudinal (A_1) and transversal (A_2) magnetization decays as dependent on the frequency (1—20 MHz, 2—60 MHz, 3—120 MHz) in the cases of homogeneous (1, 2, 3) and heterogeneous (1', 2', 3') distributions of correlation times ($q^2=0.4$, $\tau_R=2$ ns, $\tau_i=50$ ps, $\delta=0.4$)

и провести тщательный анализ формы спадов намагниченностей для большого числа хорошо разрешенных линий в широком динамическом диапазоне. Обнаружение и анализ динамической гетерогенности микроокружений может дать ценную информацию о крупномасштабных медленных движениях в белках.

Авторы выражают искреннюю благодарность Л. В. Абатурову за полезное обсуждение материалов статьи.

ANALYSIS OF DATA ON MAGNETIC RELAXATION OF ^{13}C NUCLEI IN GLOBULAR PROTEINS

V. D. Fedotov, L. S. Kivaeva

Institute of Biology, the Kazan Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Kazan

Summary

Protonated carbons' relaxation in bovine pancreatic trypsin inhibitor and ribonuclease S has been analyzed by the model-free approach based on ideology of relaxation treatment in solid polymers. Microdynamic parameters of CH_3 -, CH_2 -, aromatic CH-groups (anisotropy parameters, the most probable correlation times) are considered within the diffusion rotation-oscillation models. A model of the defect diffusion is applied to explain the backbone CH-group relaxation. A distinctive feature of the results obtained is that wide correlation time distributions are found for groups of all the types. Decays of the carbon magnetization in the wide range of microdynamic parameter values imitating the various experimental conditions are calculated to elucidate a nature of the correlation time spectra.

1. Федотов В. Д., Киваева Л. С. Новая модификация безмодельного подхода к анализу данных по ядерной магнитной релаксации в белках // Биополимеры и клетка.— 1987.— 3, № 4.— С. 171—178.
2. An approach to the mapping of internal motions in protein analysis of ^{13}C relaxation in the bovine pancreatic trypsin inhibitor / A. A. Ribeiro, K. King, Ch. Restivo, O. Jardetzky // J. Amer. Chem. Soc.— 1980.— 102, N 12.— P. 4040—4051.

3. Lipari G., Szabo A. Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 1. Theory and range of validity // *Ibid.*— 1982.— 104, N 17.— P. 4546—4559.
4. Lipari G., Szabo A. Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 2. Analysis of experimental results // *Ibid.*— P. 4559—4770.
5. Федотов В. Д. Ядерный магнитный резонанс и внутримолекулярная подвижность белков // Молекуляр. биология.— 1983.— 17, № 3.— С. 493—504.
6. Федотов В. Д. Импульсный ЯМР в блочных полимерах: Дис. ... докт. физ.-мат. наук: 01.04.15.— Защищена 03.06.81; Утв. 17.04.82.— Казань, 1981.— 273 с. Библиогр.: с. 254—273.
7. ^{13}C NMR studies of the molecular dynamics of selectively ^{13}C -enriched ribonuclease complexes / L. T. Hugher, J. S. Cohen, A. Szabo et al. // *Biochemistry.*— 1984.— 23, N 16.— P. 4390—4394.
8. Химмельблау Д. Прикладное нелинейное программирование.— М.: Мир, 1975.— 543 с.
9. Fedotov V. D., Feldman Yu. D., Yudin I. D. On the rotational diffusion of globular proteins in aqueous solutions // *Stud. biophys.*— 1985.— 107, N 2.— P. 83—90.
10. Lipari G., Szabo A., Levy R. M. Protein dynamics and NMR relaxation: comparison of simulations with experiment // *Nature.*— 1982.— 300, N 5880.— P. 197—198.
11. Howarth O. W. Effect of internal librational motions on the ^{13}C nuclear magnetic resonance relaxation times of proteins and peptides // *J. Chem. Soc. Faraday Trans. Part 2.*— 1978.— 74, N 6.— P. 1031—1041.
12. Lehman M. S., Koetzle T. F., Hamilton W. C. Precision neutron diffraction structure determination of protein and nucleic acid components. 1. The crystal and molecular structure of the amino acid L-alanine // *J. Amer. Chem. Soc.*— 1972.— 94, N 8.— P. 2657—2660.
13. Deisenhofer J., Steigemann W. Crystallographic refinement of the structure of bovine pancreatic trypsin inhibitor at 1.5 Å resolution // *Acta crystallogr. B.*— 1980.— 36, N 1.— P. 238—250.
14. The three-dimensional structure of ribonuclease S / H. W. Wyckoff, D. Tsernoglou, A. W. Hanson et al. // *J. Biol. Chem.*— 1970.— 245, N 2.— P. 305—328.
15. McCammon J. A., Wolynes R. G., Karplus M. Picosecond dynamics of tyrosine side chain in proteins // *Biochemistry.*— 1979.— 18, N 6.— P. 927—942.
16. Wang C. C., Pecora R. Time correlation function for restricted rotational diffusion // *J. Chem. Phys.*— 1980.— 72, N 10.— P. 5333—5340.
17. Karplus M., Gelin B. R., McCammon J. A. Internal dynamics of proteins. Short time and long time motions of aromatic sidechain in PTI // *Biophys. J.*— 1980.— 31, N 1.— P. 603—618.
18. Van Gunsteren W. F., Karplus M. Protein dynamics in solution and in a crystalline environment: a molecular dynamics study // *Biochemistry.*— 1982.— 21, N 10.— P. 2260—2274.
19. McCammon J. A., Gelin B. R., Karplus M. Dynamics of folded proteins // *Nature.*— 1977.— 267, N 5603.— P. 585—590.

Ин-т биологии Казан. фил. АН СССР

Получено 21.04.86

БДК 577.217.53

**АНАЛИЗ КИНЕТИЧЕСКОЙ СХЕМЫ СТАДИИ ЭЛОНГАЦИИ
БЕЛКОВОГО СИНТЕЗА В РАМКАХ ГИПОТЕЗЫ
О СТЕРЕОСПЕЦИФИЧЕСКОЙ СТАБИЛИЗАЦИИ
КОДОН-АНТИКОДОНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ НА РИБОСОМЕ.
2. СООТНОШЕНИЕ СКОРОСТЕЙ ГИДРОЛИЗА GTP
И ЭЛОНГАЦИИ ПОЛИПЕПТИДНЫХ ЦЕПЕЙ**

А. И. Потапов, Б. Н. Гольдштейн, С. Р. Сайфуллин, А. В. Ельская

Для объяснения механизма усиления стабильности и специфичности кодон-антикодонных комплексов на рибосоме при трансляции предложена гипотеза о прямом взаимодействии некоторого участка X декодирующего центра рибосомы с кодон-антикодонным дуплексом [1—4].

Предложена детализированная схема рабочего цикла элонгации [4], теоретический анализ кинетических свойств которой в рамках зависимости скорости элонгации от концентрации аминоацил-tРНК и