

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФИЗИКИ

КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ ФИЗИКИ

Направление 03.04.02 – Физика

Профиль: Медицинская физика


МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

**СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ С-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА БЕЛКА
HPF БАКТЕРИИ STAPHYLOCOCCUS AUREUS МЕТОДАМИ
СПЕКТРОСКОПИИ ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА
ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ**

Работа завершена:

Студент 2 курса группы 06-719

" 14 " июня 2019 г.




(К.А. Раскита)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель

к.ф.-м.н., доцент

" 14 " июня 2019 г.

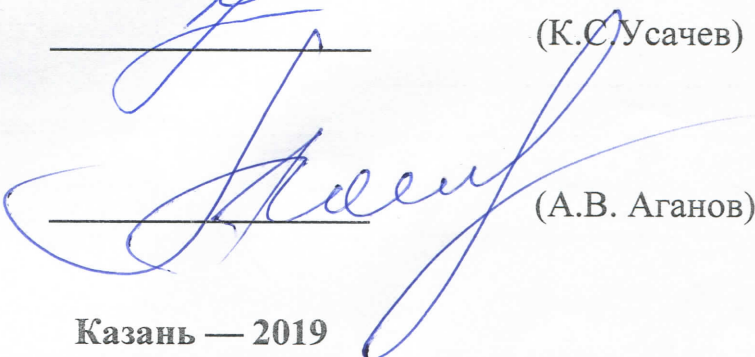


(К.С. Усачев)

Заведующий кафедрой

д.х.н., профессор

" 14 " июня 2019 г.



(А.В. Аганов)

Казань — 2019

Оглавление

| | |
|---|----|
| Список сокращений | 3 |
| Введение..... | 4 |
| 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 7 |
| 1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> | 7 |
| 1.2 Фактор гибернации SaHPF из <i>S.aureus</i> | 8 |
| 1.3 Структура фактора HPF из <i>E.Coli</i> | 10 |
| 1.4 Структура SaHPF предсказанная с помощью биоинформатических методов..... | 13 |
| 1.5 Протокол выделения и очистки белка | 15 |
| 1.6 Основы спектроскопии ЯМР | 17 |
| 1.7 Многомерные эксперименты спектроскопии ЯМР..... | 20 |
| 1.7.1 Эксперимент HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Correlation spectroscopy)..... | 22 |
| 1.7.2 HNCO и HNCA | 23 |
| 1.7.3 Эксперимент HNCO | 24 |
| 1.7.4 Эксперимент HNCA | 25 |
| 1.7.5 Эксперимент HN(CO)CA | 26 |
| 1.7.6 Эксперимент CBCANH | 28 |
| 1.7.7 Эксперимент CBCA(CO)NH | 29 |
| 1.8 Спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) | 31 |
| 1.8.1 Ошибки в измерении межпротонных расстояний..... | 35 |
| 1.8.2 Эксперименты ^{15}N - ^1H NOESY HSQC и ^{13}C - ^1H NOESY HSQC..... | 37 |
| 1.8.3 ^{13}C - ^1H NOESY HSQC | 38 |
| 1.8.4 Минимизация энергии и имитация отжига | 39 |
| 1.8.5 Минимизация энергии..... | 40 |
| 1.8.6 Имитация отжига..... | 40 |
| 2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦА БЕЛКА ДЛЯ СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР | 43 |
| 2.1 Приготовление образцов для спектроскопии ЯМР..... | 43 |
| 2.3 Очистка белка SaHPF на колонке со смолой Ni-NTA Superflow..... | 44 |
| 2.4 Осаждение белка в растворе | 45 |
| 2.5 Конечная стадия очистки белка SaHPF на гель-фильтрационной колонке Superdex 75 10/300 | 45 |
| 2.6 Электрофорез белка..... | 45 |
| 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ..... | 48 |
| 3.1 Эксперименты ^{15}N - ^1H HSQC..... | 49 |
| 3.2 Отнесение сигналов в спектрах ЯМР | 50 |
| Заключение..... | 56 |
| Библиографический список..... | 57 |

Список сокращений

| | |
|--|--|
| Да, кДа | дальтон, килодальтон |
| м.д. | миллионные доли (ppm - parts per million) |
| н.м. | нанометр |
| Å | ангстрем |
| ЯМР | ядерный магнитный резонанс |
| ЯЭО | ядерный эффект Оверхаузера |
| ДНК | дезоксирибонуклеиновая кислота |
| HPF | Hibernation promoting factor |
| SaHPF | Staphylococcus aureus hibernation promoting factor |
| E. Coli | Escherichia coli |
| S.epidermidis | Staphylococcus epidermidis |
| S. saprophyticus | Staphylococcus saprophyticus |
| RMF | Ribosome modulation factor |
| SRA | the Sequence Read Archive |
| IPTG | Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside |
| LB | Lysogeny broth |
| 1D, 2D, 3D | одно-, дву-, трехмерный (ая) |
| HSQC | Heteronuclear Single Quantum Coherence |
| NOESY | Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy |
| COSY | COrelated Spectroscopy |
| INEPT | insensitive nuclei enhanced polarization transfer |
| DEPT | distortionless enhancement by polarization transfer |
| <u>Обозначения атомов полипептидной цепи</u> | |
| C' | карбонильный атом углерода основной цепи |
| N | амидный атом азота основной цепи |
| HN | амидный протон основной цепи |
| C α , β , γ , δ , ϵ ,... | α , β , γ , δ , ϵ ,... - углеродные атомы |
| Ha, β , γ , δ , ϵ ,... | протоны α , β , γ , δ , ϵ ,... - углеродных атомов |

Введение

В 1881 году, в микробиологии появился термин “**staphylococcus**”, описывающий определенный вид бактерии. **Кокки** или **kokkos** (с греч. "Зернышко") – представляют собой бактерии, округлой или немного вытянутой формы. В мире существует множество самых разнообразных кокков, которые сосуществуют в организме человека в течение всей его жизни, но, наиболее известный большинству микроб – это стафилококк. Большинство стафилококков окрашены в фиолетовый цвет и, рассматривая их под микроскопом видно, что кокки собираются в группы, напоминая собой гроздь винограда, в связи с чем они и получили свое название, *staphylos* (по-гречески "гроздь").

Стафилококки – положительные неподвижные микроорганизмы, в определенном количестве находящиеся на поверхности тела человека (в носо- и ротоглотке, на коже). На данный момент обнаружено 27 видов, из которых 14 постоянно присутствуют на кожных покровах и слизистых человека. Несмотря на то, что большинство стафилококков являются почти безвредными для человека: стоит запомнить, что из тех 14 видов, существуют 3 вида имеющих генетический фактор патогенности, способные привести к развитию инфекционных процессов.

К представителям провоцирующих воспалительные процессы различной локализации относятся: **золотистый стафилококк** (*S.aureus*), **эпидермальный стафилококк** (*S.epidermidis*), **сапрофитный стафилококк** (*S. saprophyticus*). В данной работе объектом исследования являлся золотистый стафилококк, наиболее опасный и живучий высоковирулентный вид болезнетворных кокков.

Стафилококковая инфекция – в клинической практике обобщенное название ряда заболеваний, вызванные стафилококком (на данный момент их более сотни). Благодаря высокой устойчивости к антибиотикам штаммов патогенного возбудителя, стафилококковые инфекции находятся в первых рядах инфекционных заболеваний, носящих гнойно-воспалительный

характер. Выделяя экзотоксины и особые вещества, стафилококк подавляет иммунные механизмы организма, становясь причиной воспаления органов и тканей. Поражая ткани кожи, стафилококк проявляется в виде гнойничковых поражений, фурункулов, пиодермии, флегмон и абсцессов. При поражении внутренних органов, лёгких или мозга, стафилококк вызывает ангину, менингит, пневмонию, в случае массивных и тяжелых поражений, имея устойчивость к терапии, часто приводит к абсцессу, сепсису и летальному исходу. Основная роль возникновения отравления принадлежит энтеротоксину продуцируемому стафилококком, имеющий антигенные свойства. Попадая в продукты питания *S.aureus* образует токсин, приводящий к острым пищевым токсикоинфекциям, гастроэнтеритам и воспалениям тонкой и толстой кишки.

Для получения трехмерных структур макромолекул белков и нуклеиновых кислот, применяют различные методы, к ним относят сверхбыструю лазерную спектроскопию, ЯМР-спектроскопию, рентгеноструктурный анализ и криоэлектронную микроскопию. Данные методы используются в структурной биологии, для понимания строения и функционирования живых систем на молекулярном уровне.

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) высокого разрешения – это метод исследования, состоящий из разнообразных экспериментов (импульсных последовательностей), предназначенных для получения определенной конкретной информации, помогающей определить динамику и строение органических соединений в растворе. Данные используются как в медицинской физике, так и в структурной биологии и органической химии [1]. Например, используя спектроскопию ядерного эффекта Оверхаузера (NOESY), определяются межпротонные расстояния между магнитными ядрами исследуемой молекулы [2].

Целью данной работы является определение пространственной структуры С-концевого домена белка SaHPF методом спектроскопии ЯМР высокого разрешения.

Для достижения указанной цели необходимо выполнение следующих **задач:**

- 1) Разработка протокола выделения и очистки белка, меченного по изотопам ^{13}C , ^{15}N для структурных исследований методом спектроскопии ЯМР.
- 2) Регистрация многомерных спектров ЯМР по ядрам ^1H , ^{13}C , ^{15}N .
- 3) Анализ экспериментальных данных ЯМР, отнесение сигналов в спектрах к соответствующим магнитным ядрам молекулы белка.
- 4) Расчет пространственной структуры белка на основе экспериментальных данных ЯМР методом молекулярной динамики.

Обнаруженная в стационарной фазе рибосома золотистого стафилококка, обладает особенной функцией, которая замедляет белковый синтез, при воздействии на бактериальную клетку стрессовых условий. При взаимодействии рибосомы с белком образуется трансляционно не активный 100S димер рибосом. Благодаря устойчивости к неблагоприятным внешним условиям, клетки обеспечивают резистентность к антимикробным агентам. **Актуальность исследования** заключается в получении неизвестной, на данный момент, структуры данного белка, которая послужит основой для дальнейших исследований медико-биологических задач.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus, он же золотистый стафилококк – имеет шаровидный вид, представляющий собой неподвижный и аэробный (потребляющий кислород) прокариот, он же вызывает разнообразные воспаления как у детей так и взрослых. Из-за золотистого свечения при посеве в питательную среду, стафилококк приобрел свое «золотистое» название. Несмотря на то, что в небольших количествах бактерия обитает на коже и слизистых практически в каждом организме человека, при нормальной микрофлоре подавляется рост стафилококка, тем самым не позволяя размножаться и активно расти. Но, стоит появиться провоцирующим факторам в виде ослабления защитных сил организма, микроб проявляет свою патогенность. Большинство заболеваний, где фигурируют стафилококки, подразумевают присутствие именно золотистого стафилококка. Обладая специфичной мутацией в рибосоме, это довольно живучая бактерия, т.к. при предотвращении связывания препарата с бактерией, приобретает высокая резистентность к антибиотику, при этом спокойно переносит отсутствие воды и высокие температуры, также нейтрален к спирту, соли, уксусу и перекиси водорода, вырабатывая каталазу, особый фермент, разрушающий перекись, тем временем микробом усваивается кислород.

Многие бактерии обладают похожей устойчивостью, но, именно золотистый стафилококк крайне стоек во внешней среде. Особенность в том, что обычные микробы, погибая при различных неблагоприятных условиях, образуют споры, а после улучшения и нормализации внешних факторов, споры вновь преобразуются в бактерии, а те в свою очередь начинают инфицировать организм. Стафилококк же никаких спор не образует и на него никак не влияет изменение условий среды, он всегда готов к заражению.

Пенициллаза и лидаза, особые ферменты, которые вырабатывает стафилококк, практически полностью защищают его от любых антибиотиков пенициллинового ряда, т.к. расплавляя кожные покровы и потовые железы, бактерия приобретает способность проникать в организм. Также микроб продолжает быть активен и при высушивании, выживает под прямыми солнечными лучами в течение 12-ти часов, и при кипячении на протяжении 10 минут при 150 °С.

1.2 Фактор гибернации SaHPF из *S.aureus*

Белок SaHPF, клонированный в *E.coli*, является объектом исследования данной работы.

SaHPF - Staphylococcus aureus hibernation-promoting factor – является белком инактивации рибосомы грамположительной бактерии. При взаимодействии белка HPF с 30S субъединицей рибосомы, в активных сайтах нарушается связывание с антибиотиком. А связывание RMF (Ribosome maturation factor) с 50S субъединицей, из-за изменения конформации рибосомы, приводит к димеризации взаимодействуя с субъединицей другой рибосомой [3]. Потеря трансляционной активности рибосомы связана с димерной частицей и константой седиментации 100S [4], не синтезируя белок, стрессовые условия никак не влияют на клетку, и она выживает. Предсказанная модель белка SaHPF состоит из двух доменов и соединяющей их петли [5], к таким выводам привели использование различных биоинформатических программ [6,7,8]. Т.к. меняется положение петли в пространстве, меняется и положение доменов. Благодаря сравнению гомологичных последовательностей и структур SaHPF, определили необходимые важные участки функционирования с рибосомой.

Метод молекулярной динамики, используется для имитации движения молекул, полученные результаты позволяют рассчитать структуры и характеристики системы, а также понять динамику поведения белка в

растворе [8], а также увидеть особенности в строении и поведении молекулы, находящейся в условиях близких к физиологическим [11].

В стационарной фазе роста *Escherichia coli*, при помощи RMF (фактор модуляции рибосомы) и белков, способствующих гибернации (HPF), 70S рибосомы димеризуются, образуя 100S рибосомы, утрачивающие трансляционную активность. Присутствующие во всех фазах роста *S. aureus* 100S рибосомы имеют самые высокие уровни перехода от экспоненциальной фазы к стационарной. Анализируя белки в исследуемом образце, которые связаны с неочищенными рибосомами, и используя при этом свободные радикалы, снижающие 2-D PAGE и MALDI TOF / MS, определялись ключевые факторы, участвующие в образовании 100S.

В процессе выяснилось, что в большинстве случаев SaHPF связывался с 70S компонентами в 100S рибосомах в молярном соотношении 1:1 по отношению к 70S, при том, что некоторые SaHPF присутствовали и в свободных 70S рибосомах. Промывка неочищенных рибосом раствором соли с высокой концентрацией освободила SaHPF и диссоциировала 100S рибосомы с их 70S-компонентами. Инкубирование 70S рибосом с очищенным белком SaHPF технологией *in vitro*, привело к повторному их связыванию с образованием 100S димеров. Полученные результаты позволили предположить, что ключевым белком гибернации рибосом у *S. aureus* является SaHPF, именно он участвует в формировании 100S рибосом.

При повышении роста клеток кишечной палочки от экспоненциальной до стационарной фазы, в них начинают происходить значительные морфологические и физиологические изменения. Подобные изменения затрагивают более чем 100 генов [12]. При снижении питательных веществ в среде, происходит переход бактерий в стационарную фазу роста, при этом подавляется синтез белков, что приводит к появлению нескольких процессов. У *E.coli* из 70S рибосом образуются димеры 90S, за счет выработки так называемых связывающих белков RMF (коэффициент модуляции рибосомы) [13], SRA (стационарная фаза индуцированного рибосом-ассоциированного

белка) [13] и белков YfiA и YhbH [14]. При этом частица 100S рибосомы образуется параллельно с RMF, а RMF мешает связыванию рибосом, предотвращая взаимодействие с кодонами мРНК и формирует 100S [15].

Метод *in vivo*, продемонстрировал формирование 100S частиц YhbH вместе с RMF (HPF) «фактор, способствующий гибернации», в противовес этому YfiA, наоборот препятствует образованию 100S частиц, несмотря на то, что имеет схожесть гомологии последовательностей с HPF практически в 40% случаев [16].

Переход в стационарную фазу и подавление синтеза белка регулируется несколькими процессами RMF и HPF. Когда рибосомы 70S димеризуются под действием белка известного как RMF, образуются димеры 90S. Далее происходит связывание с белком HPF, и 90S преобразуются в рибосомную частицу 100S, в которой поверхность димеризации представляется двумя 30S субъединицами. Данный результат был подтвержден методом исследования *in vitro* с очищенными белками HPF и RMF [17,18]. В ходе этих исследований выдвинулась гипотеза о том, что цикл рибосом содержит петлю, так называемую «процессом гибернации» в *E. coli* [19].

Исследование 100S частиц рибосом бактерии *Staphylococcus aureus* отличающихся от гамма-группы протеобактерий, выявили новый тип 100S рибосом, с удлинённым фактором SaHPF [20].

1.3 Структура фактора HPF из *E. Coli*

HPF принимает α - β - β - β - α топологию (2 α -спирали и три β -складчатых структуры), состоящую из слоя смешанных параллельных и антипараллельных β -листов, и двух α -спиралей.

β -лист состоит из β_1 (остатки 1-7), β_2 (35-41), β_3 (47-55) и β_4 (58-66), и располагается над двумя α -спиралями: α_1 (13-29) и α_2 (69-91) (рис.1B). Как и ожидалось на основе высокой гомологии аминокислотной последовательности белка из *E.coli* и *S.aureus*, общая структура HPF

гомологична структуре YfiA (рисунок 1С) [22, 23]. Средняя квадратичная величина отклонения атомов основной цепи для HPF и YfiA составляет 1,4 Å (остатки 1-7, 35-41, 47-55, 58-66, 13-29, 69-88).

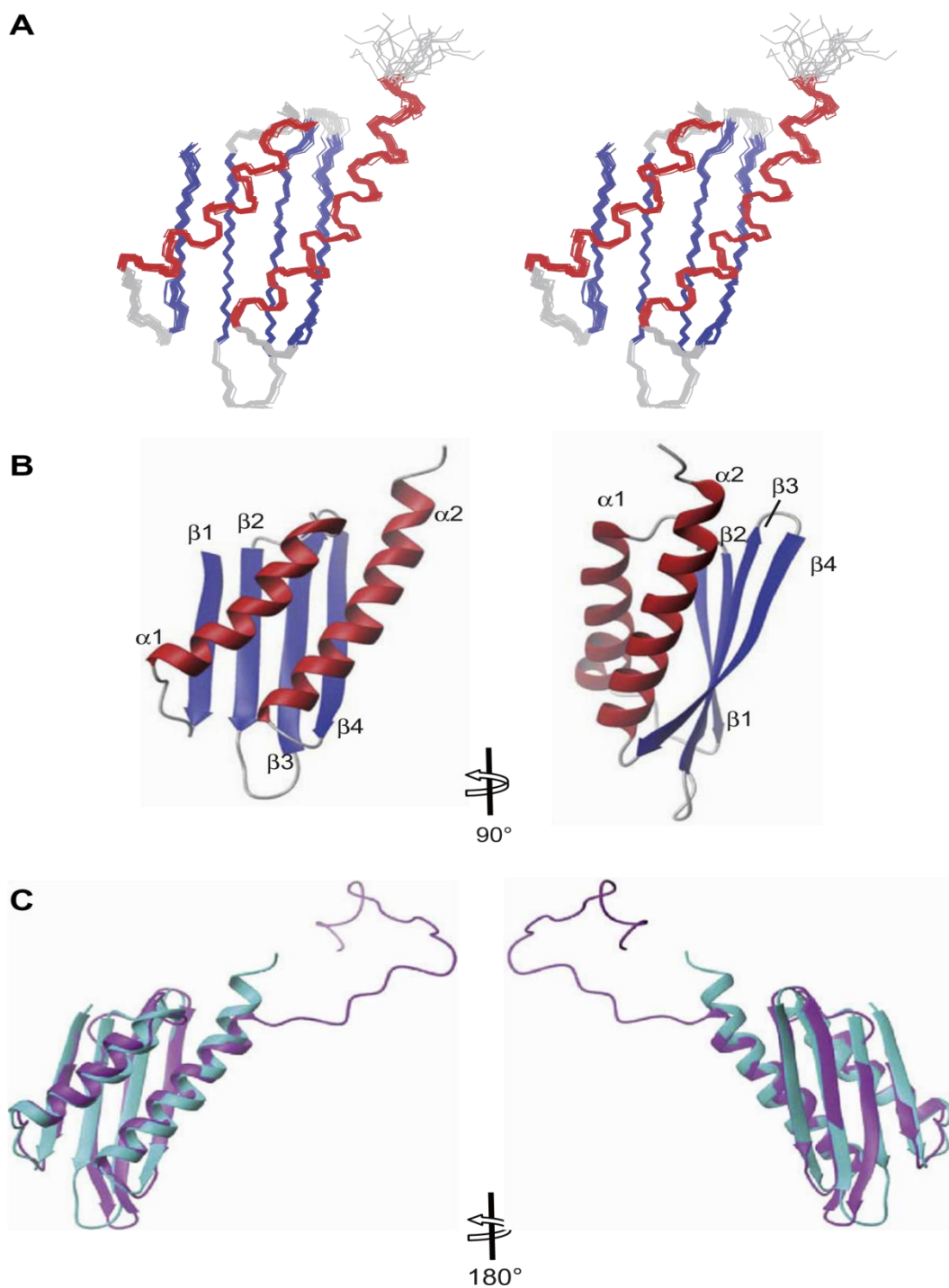


Рисунок 1 - Структура фактора HPF из *E.Coli*. (А) Суперпозиция 20-ти структур белка из ансамбля. Спираль и нити обозначены красным и синим цветами. (В) Ленточное представление вторичной структуры белка HPF в двух ориентациях (поворот на 90 градусов относительно горизонтальной оси). (С) Сравнение структуры факторов HPF и YfiA. Ленточные модели HPF и YfiA окрашены в голубой и пурпурный цвета

В формировании третичной структуры, большую роль играют гидрофобное взаимодействие гидрофобных остатков боковых цепей HPF и YfiA. На рис.2 изображены гидрофобные взаимодействия в гидрофобном ядре белка HPF. Гидрофобные остатки, Leu2 и Ile4 на β_1 , Val36, Val38 и Leu40 на β_2 , Ala51 и Leu53 на β_3 , а Ile60 и Ala62 на β_4 - остатки, обращены внутрь на β -листе. Остатки на α -спиралях накладываются на гидрофобное ядро β -листа, в итоге: Leu15, Val19, Phe23, Leu26 и Phe30 на α_1 и Met69, Ile73, Leu76, Ile77, Leu80 и Leu84 на α_2 . На всей протяженности между HPF и YfiA сохраняются гидрофобные остатки, кроме Phe30, в связи с чем вносится значительный вклад в общую складку между HPF и YfiA [23].

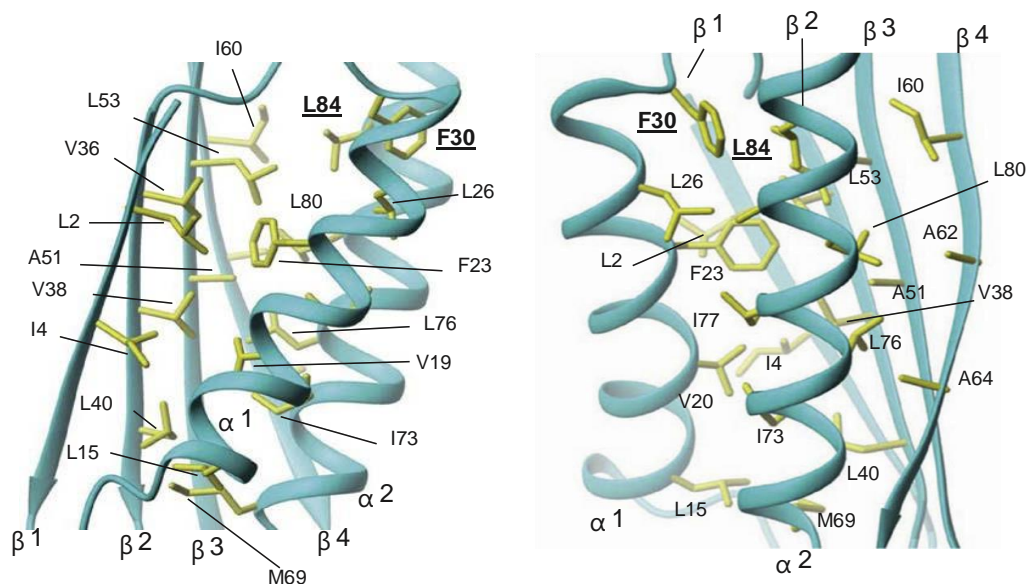


Рисунок 2 – Показана структура гидрофобного ядра фактора HPF, который формируется при взаимодействии боковых цепей аминокислотных остатков (окрашены желтым). Расположение гидрофобных остатков фактора HPF такое же, как в факторе YfiA. Выделяющиеся остатки Phe30 и Leu84 отмечены жирным шрифтом и пунктирной линией

1.4 Структура SaHPF предсказанная с помощью биоинформатических методов

Программа Robetta применяется для построения визуальной модели предсказанных структур. Для белка SaHPF использовали известные ранее данные для белков 1IMU и 3LYV, на их основе получали представление о структуре [24].

Предсказанная модель структуры указала что положение доменов относительно друг друга имеют различную конформацию, благодаря петле между ними. И одной из особенностей белка SaHPF, предположительно считают недостаточную организованность второго домена вместе с петлей.

В существующей базе данных PDB, содержится большое количество разрешенных структур разнообразных белков с различной степенью идентичности подходящих аминокислотной последовательности для N-концевого домена белка SaHPF. Во втором домене, содержащем петлю имеется сложность: структура 3LYV содержит 6 разнообразных моделей, отсутствующих для модели петли. Наложение пространственных структур белка друг на друга, показали довольно полное совпадение гомологичных структур для этих доменов (рисунке 3). Из-за подвижности петли вместе со вторым доменом, возникают сложности определения структуры исследуемого белка SaHPF.

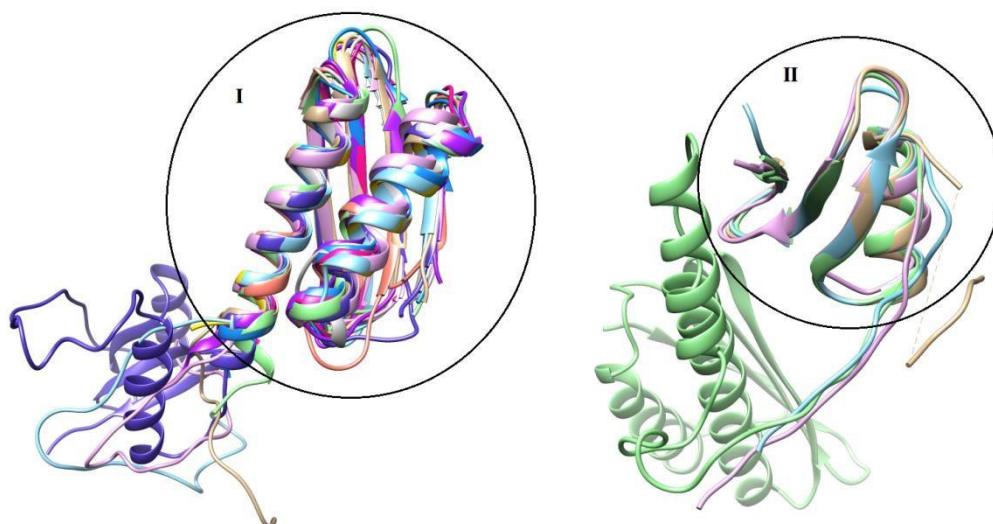


Рисунок 3 - Наложение предсказанной структуры белка SaHPF на гомологичные структуры: I – для первого домена, II – для второго домена. Разными цветами выделены разные белки

Для анализа предсказания использовались структуры двух схожих функциями белков 4V8H (3V26) и 4V8G рибосомы *Thermus thermophilus*, позволяющих предположительно определить положение белка SaHPF с рибосомой.

Результатами было выявлено, что структура с белком HPF гомологична первому домену белка, а структура с RMF, не схожа в гомологии, но схожа по функциям со вторым доменом. Так же HPF и RMF связываются между собой петлей в размере 40 Å, с промежутком между доменами в 25Å, при этом наблюдалась подвижность и самой петли (рисунок 4).

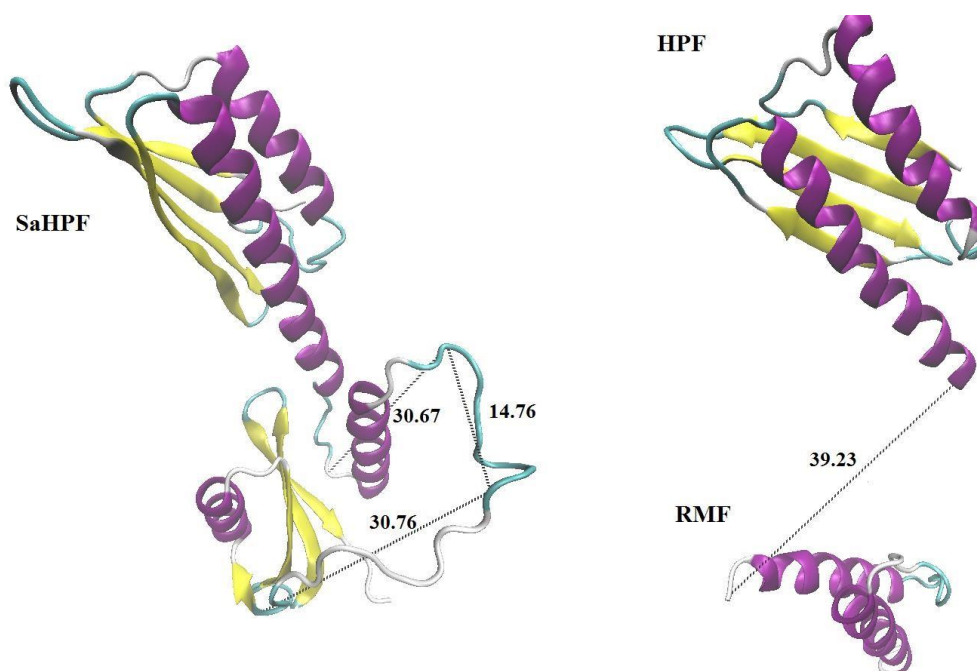


Рисунок 4 - Визуализация структур белков: слева – предсказанная модель белка SaHPF, с указанием расстояния между доменами; справа – модели белков HPF и RMF в структуре рибосомы *Thermus thermophilus*, содержащей схожие по функциям белки: 4V8H (3V26) и 4V8G, с указанием расстояния между ними

После сравнения HPF и RMF с рибосомой и структурой белка SaHPF, обнаружили способность первого домена занимать аналогичную HPF позицию в структуре рибосомы и взаимодействовать с сайтами связывания тРНК, а также с белками IF1 и IF3. Второй же домен схож с RMF, который может взаимодействовать с белками S2, S7, S11 и S18 30S субъединицы. Что касается петли, находящейся на С-конце белка YfiA, схожего с HPF, выявили, что она занимает место между двумя участками в рибосоме *T.thermophilus*, где находятся белки HPF и RMF. Именно поэтому, все вышеперечисленные сайты в структуре рибосомы стафилококка может занимать белок SaHPF [25].

1.5 Протокол выделения и очистки белка

Процесс получения образца белка включает в себя несколько этапов работы: клонирование, экспрессия, выделение и очистка методом хроматографии (рисунок 5).

Клонирование – является первым этапом работы, создается рекомбинантная плазмида, содержащая структурный ген исследуемого белка, с модификациями, улучшающими процесс выделения белка из совокупности макромолекул клетки.

Наиболее проблематичное последствие выделения белка – выпадение его в осадок внутри клетки.

Дальше происходит процесс экспрессии, выделение и очистка, связанные между собой по времени.

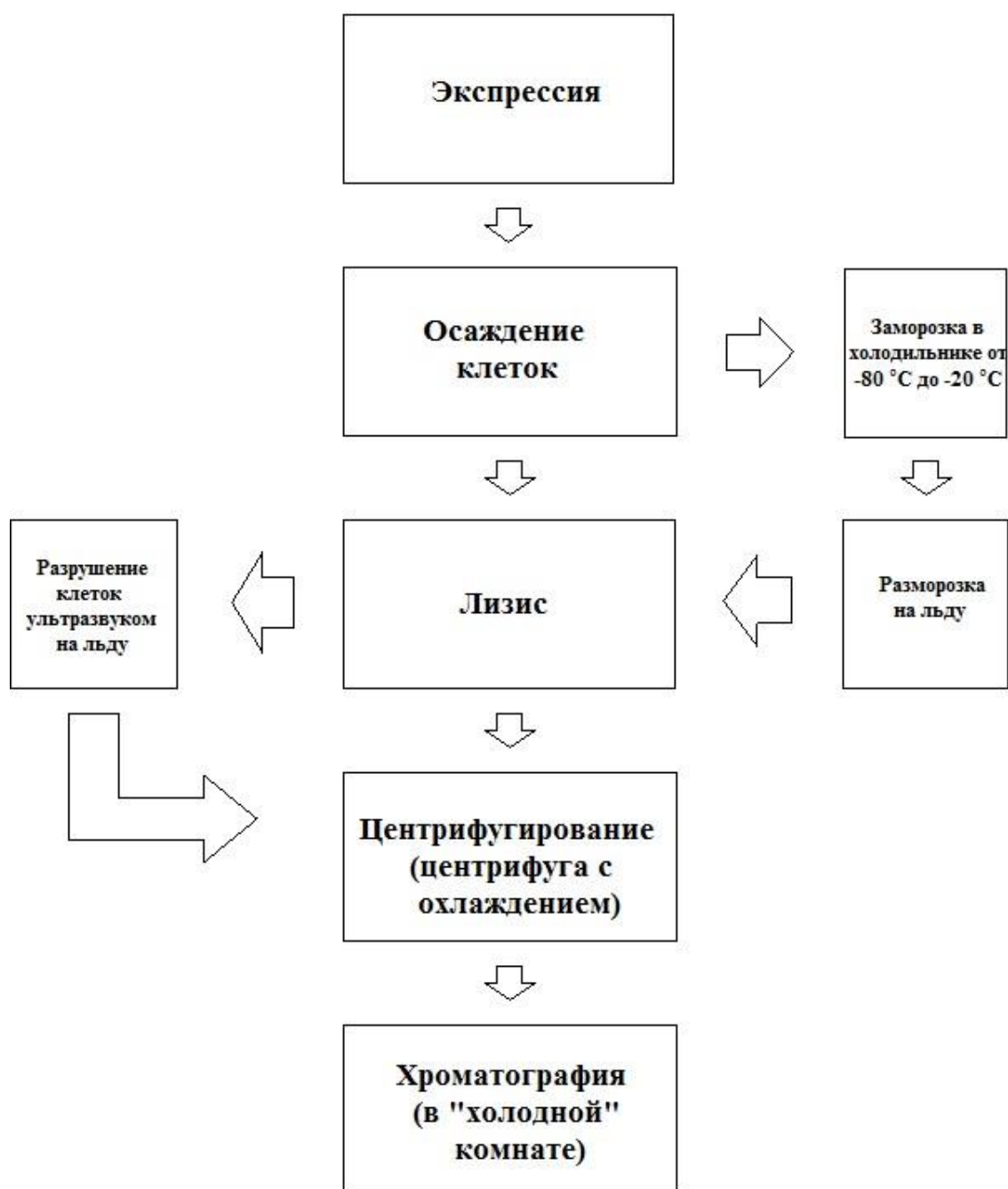


Рисунок 5 – Схема общего плана эксперимента по выделению и очистке белка

1.6 Основы спектроскопии ЯМР

В 1945 г., две группы американских физиков, под руководством Ф. Блоха и Э. Парселла открыли явление ЯМР.

Явление ядерного магнитного резонанса наблюдается во внешнем магнитном поле и представляет собой резонансное поглощение электромагнитной энергии прилагаемого радиочастотного поля веществом, имеющим ядра, спины которых отличны от нуля.

Наиболее чувствительны для эксперимента ЯМР ядра с полу целым спином. К подобным изотопам относятся: ^1H , ^{15}N , ^{13}C , и ^{19}F , ^{31}P (основные ядра, входящие в состав биомолекул). Взаимодействие постоянного магнитного поля B_0 на ядро с ненулевым спином приводит к расщеплению энергетических уровней.

В результате расщепления Зеемана, воздействие внешнего электромагнитного поля переменной частоты и совпадение частот радиочастотного поля с частотой вращения магнитного момента ядра приводит к переходу между энергетическими уровнями ядер. ЯМР наблюдается у ядер, имеющих магнитный момент. Благодаря химическому сдвигу ядра исследуемой молекулы имеют различные резонансные частоты – т.е. при взаимодействии внешнего поля с окружением определенного ядра, возникает эффект экранирования внешнего магнитного поля B_0 .

Регистрируются спектры ядерного магнитного резонанса различными способами, но наиболее удобен импульсный метод для регистрации сигнала.

При использовании импульсного метода: короткий радиочастотный импульс подается на систему, исследуемую в данном в эксперименте, затем, в заданном диапазоне импульс возбуждает резонансные переходы, и в виде спада свободной индукции наблюдается отклик от системы. Полученный сигнал связан Фурье-преобразованием и спектром ЯМР.

Атомные ядра в большинстве случаев обладают собственным механическим моментом вращения J , пропорциональным величине I , иначе говоря ядерным спином:

$$J = h I, \quad (1)$$

где J и I - операторы,

$$h = h/2\pi, \quad (2)$$

h - постоянная Планка. Ядра, с собственным механическим моментом, рассматриваются как микроскопические гироскопы. Вращательный момент связан с дипольным магнитный момент μ_I , также существует связь между механическим и магнитным моментом

$$\mu_I = \gamma_I J = h\gamma_I I, \quad (3)$$

Гиромагнитным отношением является коэффициент пропорциональности, эта величина считается константой для всех типов ядер. Величина спина I постоянна, для каждого ядра в основном состоянии. Наибольшее гиромагнитное отношение, среди стабильных изотопов, имеет ядро атома водорода ^1H [26].

Химический сдвиг

Когда молекула находится в магнитном поле, движение электронов по атомным орбиталям приводит к появлению диамагнитного момента. Эффективные токи, образующиеся в результате такого движения, согласно закону Лоренца, создают вторичное магнитное поле пропорциональное B_0 и направленное противоположно.

Локальное поле с исследуемым ядром, равно:

$$B_{\text{эфф}} = B_0 (1 - \sigma), \quad (4)$$

где σ – константа экранирования. Химический сдвиг определяется:

$$\delta = \frac{\omega - \omega_{\text{ref}}}{\omega_0} \cdot 10^{-6}, \quad (5)$$

где ω_0 – несущая частота, ω и ω_{ref} частоты резонанса исследуемого ядра и стандарта.

Сравнивая полученные данные величин химических сдвигов, с величинами трехмерных структур, и, основываясь на чувствительности к химическому окружению атому, возможен расчет вторичной структуры белка.

Перенос намагниченности

В зависимости от формы и длительности воздействия импульсов, можно контролировать перенос намагниченности ядер, формируя пики с разной интенсивностью.

Передача намагниченности может осуществляться двумя способами: спин-спиновым взаимодействием с участием электронов или диполь-дипольным взаимодействием сближенных магнитных диполей ядер. За счет спин-спинового взаимодействия определяются значения химических сдвигов атомов белка и величины констант, связанных с ним. Эксперименты использующие данный способ передачи: HNCA, HNCО, HN(CO)CA и др.

Процентное содержание изотопа ^{13}C с полуцелым спином составляет менее 1%, для ^{15}N – около 0.05%. Для того, чтобы увеличить чувствительность метода ЯМР, увеличивается содержание данных изотопов в исследуемой молекуле. Существует методика изотопного замещения всех ядер в молекуле белка, их заменяют на ^{13}C и ^{15}N , благодаря этому можно обойти ограничение по природному содержанию [28].

1.7 Многомерные эксперименты спектроскопии ЯМР

В данной работе использовались многомерные (трехмерные) эксперименты ЯМР, часто используемые для последовательного соотнесения сигналов от ядер ^1H , ^{13}C и ^{15}N в молекуле белков.

Перенос намагниченности происходит с амидных протонов, т.к. есть вероятность, их нахождения в химическом обмене с протонами воды растворителя, то подавляется сигнал воды с использованием специальной

последовательности импульсов, увеличивающей чувствительность и подавляющую насыщение амидной протонной намагниченности.

Также используются градиентные эхо-сигналы для выбора желаемых путей когерентности в сочетании с ограниченным фазовым циклом для повышения чувствительности и квадратурного обнаружения в косвенных измерениях. В рассматриваемых импульсных последовательностях есть специфические импульсы РЧ импульсы на частотах резонанса ядер C' и C^α , которые подаются по одному и тому же радиочастотному каналу спектрометра путем применения нерезонансных импульсов для одной из областей излучения, которая обозначается как «off» в таблице (рисунок б).

| Parameter | Experiments | | | | | | |
|------------------------|--------------------------------|--|--------------------------------------|--------------------------------------|--|--|--|
| | HNCO | HNCA | HN(CO)CA | HN(CA)CO | CBCANH | CBCA(CO)NH | HCCH-TOCSY |
| ^{13}C offset | C' | C^α | C^α | C' | $C^{\alpha,\beta}$ | $C^{\alpha,\beta}$ | C^{aliph} |
| “On” pulses | $C' 90^\circ$, 180° | $C^\alpha 90^\circ$, 180° | $C^\alpha 90^\circ$, 180° | $C' 90^\circ$, 180° | $C^{\alpha,\beta} 90^\circ$, 180° | $C^{\alpha,\beta} 90^\circ$, 180° | $C^{\text{aliph}} 90^\circ, 180^\circ$ |
| “Off” pulses | $C^\alpha 180^\circ$ | $C' 180^\circ$ | $C' 90^\circ$, 180° | $C^\alpha 90^\circ$, 180° | $C' 180^\circ$ | $C' 90^\circ, 180^\circ$ | $C' 180^\circ$ |
| τ (ms) | 2.7 | 2.7 | 2.7 | 2.7 | 2.7 | 2.7 | |
| δ (ms) | 13.5 | 11.0 | 13.5 | 11.0 | | | |
| δ_1 (ms) | | | 7.0 | 3.4 | 1.8 | 1.8 | 1.8 |
| δ_2 (ms) | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.8 |
| δ_3 (ms) | | | | | | 4.5 | 1.1 |
| τ_1 (ms) | | | | | 2.0 | 2.4 | |
| τ_2 (ms) | | | | | 11.0 | 3.4 | |
| τ_3 (ms) | | | | | 11.0 | 13.5 | |
| Correlations | $H_i, N_i,$ C'_{i-1} | $H_i, N_i,$ $C^\alpha_i,$ C^α_{i-1} | $H_i, N_i,$ C^α_{i-1} | $H_i, N_i,$ $C'_i,$ C'_{i-1} | $H_i, N_i,$ $C^{\alpha,\beta}_i,$ $C^{\alpha,\beta}_{i-1}$ | $H_i, N_i,$ $C^{\alpha,\beta}_{i-1}$ | $H_i^{\text{aliph}},$ $H_j^{\text{aliph}},$ C_i^{aliph} |

Рисунок б – Таблица параметров и корреляции в 3D-экспериментах ЯМР

Импульсы для C' и C^α подаются на четырехканальный спектрометр с заданными переносами в каждой углеродной области на отдельные каналы. В этом случае применяются резонансные избирательные импульсы. Последовательность INEPT помогает выборочно переносить намагниченность ^{15}N на C' или C^α , используя селективные импульсы углерода, можно избежать возникновения нежелательного переноса намагниченности, т.к. константы взаимодействия $^1J_{\text{NC}\alpha}$ и $^1J_{\text{NC}'}$ имеют между собой схожие значения (11 и 15 Гц).

При переносе намагниченности с алифатических протонов на атомы углерода связанных с ними химической связью, применяются неселективные импульсы на частоте резонанса ядер углерода, если ${}^2J_{NC'}$ и ${}^3J_{NC'}$ не равны нулю, намного меньше ${}^1J_{NC'}$ (~ 135 Гц), а INEPT, оптимизирован для ${}^1J_{NC'}$, и не имеет намагниченности, передаваемой через ${}^2J_{NC'}$ и ${}^3J_{NC'}$ [27].

1.7.1 Эксперимент HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Correlation spectroscopy)

Динамика белка может быть охарактеризована параметрами релаксации, полученными из двумерных экспериментов ЯМР основе HSQC. Это двумерный гетероядерный корреляционный эксперимент, представляет собой аналог эксперимента HMQC, с корреляцией химического сдвига протонов и химических сдвигов ядер непосредственно связанного углерода по осям ${}^{13}\text{C}$ или ${}^{15}\text{N}$ (обычно на нижней оси находится спектр протонов, а на другой углерод) через спин-спиновое взаимодействие между ядрами.

Белок состоит из ряда аминокислотных остатков отличающимися только строением боковых цепей, а основную цепь белка формируют группы NH-C-CO. Для увеличения чувствительности метода применяют методики выделения белков с обогащением по изотопам ${}^{13}\text{C}$ и ${}^{15}\text{N}$.

Эксперимент HSQC состоит из нескольких этапов:

1. INEPT (нечувствительные ядра, усиленные переносом поляризации) переносит поляризацию ядер ${}^1\text{H}$ в соседние ${}^{15}\text{N}$ (см. рисунок ниже)
2. Поляризация переносится обратно на ядра ${}^1\text{H}$
3. Сигнал от ядер ${}^1\text{H}$ записывается

Для получения меченных по изотопам белков используется метод экспрессии белка в клетках, выращенных в ${}^{15}\text{N}$ -меченых питательных средах. Каждый остаток белка, за исключением пролина, имеет амидный протон, присоединенный к азоту в пептидной связи. Спектроскопия HSQC является

корреляционным методом, при котором происходит взаимодействие между атомами азота и амидным протоном, в следствии чего на спектрах возникают пики от каждого амида. Наблюдаемые пики химических сдвигов в спектрах принадлежат к определенному остатку (кроме пролина), но, чаще всего, на практике из-за разнообразного ряда факторов отображаются не все пики [29].

Последовательность импульсов HSQC является важным инструментом в гетероядерной спектроскопии ЯМР ^1H - ^{15}N и ^1H - ^{13}C , особенно для более крупных молекул, таких как белки, намагниченность передается от протона на связанное с ним гетероядро и затем обратно, конечный сигнал регистрируется по протонному каналу.

Преимущество HSQC по сравнению с одномерными углеродными последовательностями: во-первых, этот эксперимент с обнаружением протонов, следовательно, он более чувствителен и требует меньше времени; во-вторых, получение более полной информации, поскольку одновременно собирается список пар с прямой связью ^1H - ^{13}C .

1.7.2 HNCO и HNCA

Комбинированный эксперимент HNCA / HNCO для меченных ^{15}N белков с ^{13}C , переносит намагниченности от ^{15}N до $^{13}\text{C}'$ и от ^{15}N до $^{13}\text{C}^\alpha$ (и обратно) протекающие независимо для образцов, не обогащённых ^{13}C .

Рассматривая импульсную последовательность (рисунок 7) видно, что в экспериментах импульсы одновременно подаются на частоте ядер C^α и C' (рисунок 8). При этом HNCO имеет самую высокую чувствительность. В спектре данного эксперимента наблюдаются кросспики между связанными в аминокислотной последовательности амидным протоном H_i^{N} и N_i азотом i -го остатка и карбонильным углеродом C'_{i-1} i -1го, так как константа спин-спинового взаимодействия $^2J_{\text{N}(i) \text{C}'(i)}$ имеет значение, близкое к нулю. В эксперименте HNCA вследствие того, что константы $^1J_{\text{NC}'}$ (11 Гц) и $^2J_{\text{NC}'}$ (15 Гц) имеют близкие значения, наблюдается два набора корреляций: между

корреляциям CO-N-HN, также видны корреляции боковых цепей остатков Asn и Gln.

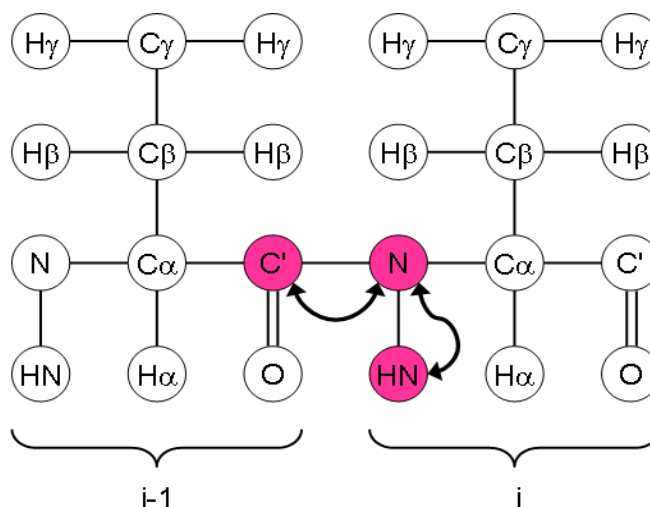


Рисунок 8 – HNCO с изображением связи ${}^1J_N^H + {}^1J_{NC'}$ [30]

1.7.4 Эксперимент HNCA

HNCA - это трехмерный ЯМР-эксперимент с тройным резонансом, обычно используемый в области ЯМР белков. Название происходит от пути переноса намагниченности эксперимента: намагниченность амидного протона аминокислотного остатка переносится на амидный азот, а затем на альфа-атомы углерода как исходного остатка, так и предыдущего остатка в аминокислотной последовательности белка и связывание с C^α сильнее, потому пики имеют более сильную интенсивность в спектрах (рисунок 9).

Напротив, в дополнительном эксперименте HNCOSA намагниченность передается только на альфа-углерод предыдущего остатка. Эксперимент HNCA используется, часто в тандеме с HNCOSA, для отнесения сигналов альфа-углеродов в белке. Спектр, полученный в этом эксперименте, имеет 3 измерения: ось 1H , ось ${}^{15}N$ и ось ${}^{13}C$. Для i остатков пики появляются в $\{H^N_{(i)}, N_{(i)}, C^\alpha_i\}$ и $\{H^N_{(i)}, N_{(i)}, C^\alpha_{i-1}\}$ в то время как для дополнительных пиков эксперимента HNCOSA появляются только в $\{H^N_{(i)}, N_{(i)}, C^\alpha_{i-1}\}$. Вместе эти два эксперимента раскрывают химический сдвиг альфа-углерода для каждого

аминокислотного остатка в белке и предоставляют информацию, связывающую соседние остатки в последовательности белка.

Коэффициентами для передач когерентности внутри и между остатками:

$$\Gamma(^1J_{NC\alpha}) = \sin(2\pi^1J_{NC\alpha}\delta) \cos(2\pi^2J_{NC\alpha}\delta) \quad (8)$$

$$\Gamma(^2J_{NC\alpha}) = \sin(2\pi^2J_{NC\alpha}\delta) \cos(2\pi^1J_{NC\alpha}\delta)$$

HNCA на 50% менее чувствителен, чем HNCO и требуется чуть больше времени для накопления для хорошего соотношения сигнал/шум [31].

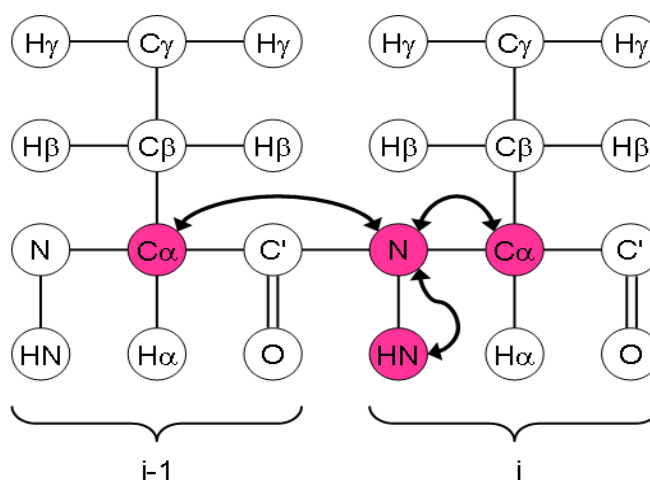


Рисунок 9 – 3D HNCA с изображением связей $^1J_{NH} + ^1J_{NC\alpha}$ и $^1J_{NH} + ^2J_{NC\alpha}$

1.7.5 Эксперимент HN(CO)CA

В эксперименте HN(CO)CA - намагниченность амидного протона аминокислотного остатка переносится на амидный азот, а затем на альфа-углерод предыдущего остатка в аминокислотной последовательности белка (напротив, дополнительный эксперимент HNCA передает намагниченность альфа-углеродам как исходного остатка, так и предыдущего остатка в последовательности).

Спектр, полученный в этом эксперименте, имеет 3 измерения: ось протона, ось ^{15}N и ось ^{13}C . Для остатка i пики будут появляться только в $\{H^N_{(i)}, N_{(i)}, C^{\alpha}_{(i-1)}\}$, в то время как для комплементарного эксперимента HNCA пики появляются в $\{H^N_{(i)}, N_{(i)}, C^{\alpha}_{(i-1)}\}$ и $\{H^N_{(i)}, N_{(i)}, C^{\alpha}_{(i)}\}$. Комбинация

результатов спектров HN(CO)CA и HNCA помогает определить положение сигналов, соответствующих каждому из остатков (рисунок 10) [33].

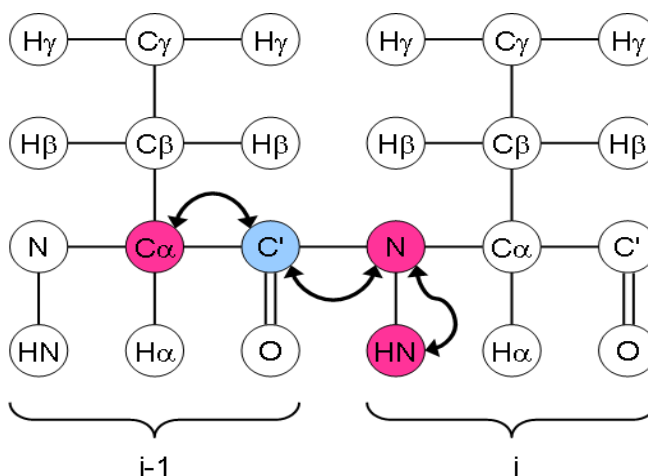


Рисунок 10 – 3D HN(CO)CA с изображением связей $^1J_{NH} + ^1J_{NCO} = ^1J_{COCA}$

Импульсная последовательность HN(CO)CA, (рисунок 11), получена из HNCO переносом размагничивания от N к C', после к C $^{\alpha}$ через $^1J_{NC'}$ и $^1J_{C'C^{\alpha}}$.

$$H \xrightarrow{J_{NH}} N \xrightarrow{J_{NC'}} C' \xrightarrow{J_{C'C^{\alpha}}} C^{\alpha}(t_1) \xrightarrow{J_{C'C^{\alpha}}} C' \xrightarrow{J_{NC'}} N(t_2) \xrightarrow{J_{NH}} H(t_3) \quad (9)$$

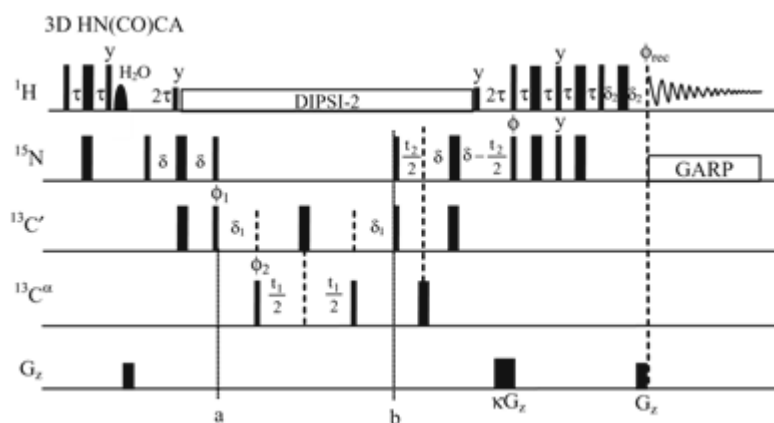


Рисунок 11 - Импульсная последовательность 3D HN(CO)CA. Эксперимент, полученный из HNCO. Последовательность HMQC-типа, используемая для переноса намагниченности из C' к C $^{\alpha}$, а затем обратно к C'

Перенос намагниченности в последовательности импульсов описываются операторами произведения H , N , C' , и C^α для амида 1H , ^{15}N , карбонила $^{13}C'$ и $^{13}C^\alpha$ [33].

1.7.6 Эксперимент CBCANH

Эксперимент 3D CBCANH специально разработан для корреляции амидных резонансов 1H и ^{15}N с резонансами внутри и между резонансами $^{13}C^\alpha$ и $^{13}C^\beta$ с помощью констант связи $^1J(N^H)$, $^{1,2}J(N, C^\alpha)$ и дополнительного $^1J(C^\alpha, ^{13}C^\beta)$. Те же самые связи могут быть сопоставлены с аналоговым экспериментом 3D HNCACB. В спектре для протонов и азотов NH групп наблюдаются четыре сигнала от ядер углерода.

В спектрах эксперимента CBCANH наблюдаются сигналы ядер 1H амидных протонов, ^{15}N i -го остатка (H_i и N_i) и сигналы ядер ^{13}C : C_{i-1}^α и C_{i-1}^β i -1-го остатка и C_i^α и C_i^β i -го остатка. Для каждого остатка видны два пика, соответствующих C^α и C^β .

Эксперимент представляет собой передачи, с использованием -COSY-последовательности переноса C^β в C^α до момента, переноса когерентности на амидные спины:

$$H_{\alpha,\beta} \xrightarrow{J_{C\alpha\beta H}} C_{\alpha,\beta}(t_1) \xrightarrow{J_{C\alpha C\beta}} C_\alpha \xrightarrow{J_{C\alpha N}} N(t_2) \xrightarrow{J_{NH}} H(t_3) \quad (10)$$

Из $^1H^\alpha$ и $^1H^\beta$ намагничивание переносится в $^{13}C^\alpha$ и $^{13}C^\beta$, затем из $^{13}C^\beta$ в $^{13}C^\alpha$. После, сначала переносится на $^{15}N^H$, далее на $^1H^N$ (рисунок 12).

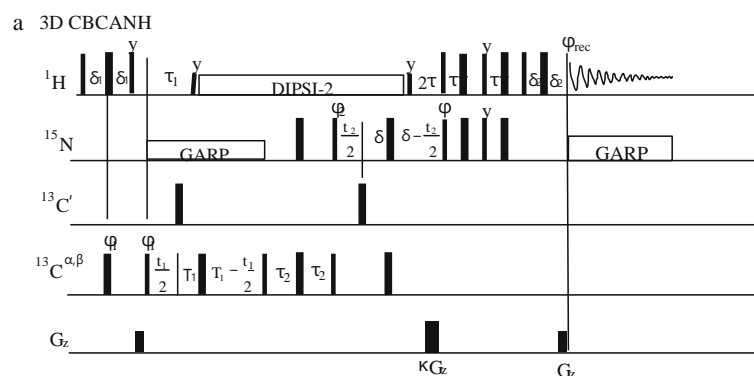


Рисунок 12 - Импульсная последовательность 3D CBCANH. Намагничивание начинается с протонов H^α и H^β и, наконец, переносится на протоны HN, и последовательность INEPT используется для всех этапов обратного переноса

Когерентность от C^{α}_{i-1} может переноситься через $^{15}N_{i-1}$, или $^{15}N_i$. Для каждой амидной группы отображаются два пика C^α и C^β своего и i -го остатка (рисунок 13). Химический сдвиг одновременно записывается на $^{13}C^\alpha$ и $^{13}C^\beta$, и проявляются в одном измерении, а также в двух других измерениях $^{15}N^H$ и $^1H^N$.

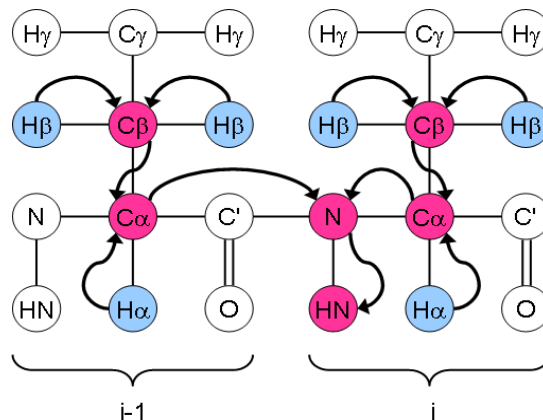
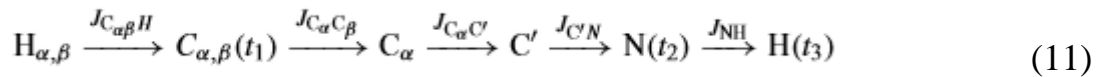


Рисунок 13 - 3D CBCANH с изображением связей

1.7.7 Эксперимент CBCA(CO)NH

Эксперимент CBCA(CO)NH позволяет наблюдать связь частот амидного протона и азота основной цепи одного остатка с частотами альфа- и бета-углерода предыдущего остатка. Спектр содержит аналогичную информацию, что и HN(CO)CA. Эксперимент CBCA (CO) NH менее

чувствителен, но, кроме того, предоставляет частоты $^{13}\text{C}^\beta$, которые играют важную роль в идентификации типа остатка и вторичной структуры, а также для последовательного отнесения сигналов в спектре белка. Поток намагниченности следующий:



Последовательность импульсов эксперимента СВСА(CO)NH изображена на рисунке 14 [35]:

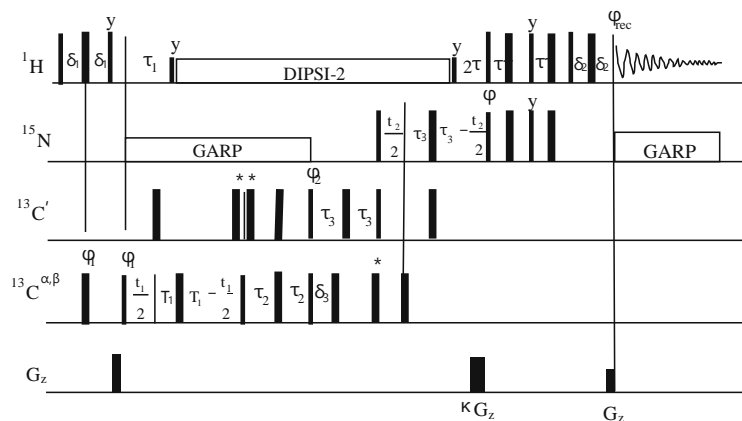


Рисунок 14 - Импульсная последовательность 3D СВСА(CO)NH. Намагничивание начинается с протонов H^α и H^β и пропускается через H^N протоны

Перенос намагничивания начинается с $^1\text{H}^\alpha$ и $^1\text{H}^\beta$ в $^{13}\text{C}^\alpha$ и $^{13}\text{C}^\beta$, затем с $^{13}\text{C}^\beta$ в $^{13}\text{C}^\alpha$. После переносится на $^{13}\text{C}'$, и на $^{15}\text{N}^H$, а затем на $^1\text{H}^N$ для конечной регистрации. Одновременная регистрация химического сдвига происходит на $^{13}\text{C}^\alpha$ и $^{13}\text{C}^\beta$, проявляющиеся в одном измерении. Химический сдвиг не регистрируется на $^{13}\text{C}'$ (рисунок15) [36].

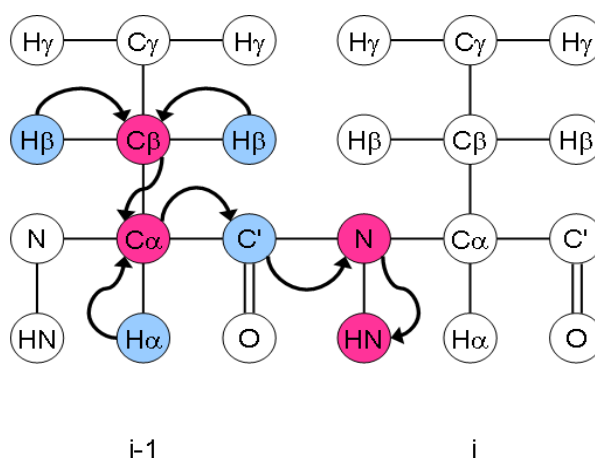


Рисунок 15 – 3D CBCA(CO)NH с изображением связей $^1\text{H}^\alpha(i-1) / ^1\text{H}^\beta(i-1) \rightarrow ^{13}\text{C}^\alpha(i-1) / ^{13}\text{C}^\beta(i-1) \rightarrow ^{13}\text{C}'(i-1) \rightarrow ^{15}\text{N}(i) \rightarrow ^1\text{H}^\text{N}(i)$

Комбинация результатов от HN(CO)CACB и HNCACB помогает определить положение сигналов каждого из остатков.

1.8 Спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО)

При насыщении соответствующих резонансных состояний спина электрона, происходит изменение интенсивности сигнала в спектрах ЯМР, такое явление впервые было обнаружено А.В. Оверхаузером [37]. В дальнейшем явление получило название «эффект Оверхаузера». Основой для определения пространственной структуры методом ЯМР является взаимодействие двух ядерных спинов, связанных между собой диполь-дипольным взаимодействием.

Эффект Оверхаузера и ядерный эффект Оверхаузера основаны на изменении поляризации, наблюдающейся в связанной системе при условии изменения населенности одной или нескольких подсистем. Диполь-дипольное взаимодействие, определяет изменение населенностей, и зависит от расстояния между взаимодействующими спинами, как и величина ЯЭО аналогично зависит от расстояния между ними. Таким образом, эта зависимость позволяет определить межатомные расстояния [38].

При насыщении или инвертировании протона, происходит усиление интенсивности между пространственно-близкими протонами, данное явление считается эффектом ядерного перегрева (ЯЭО). ЯЭО является уникальным среди методов ЯМР, т.к. не зависит от J-связей через связь, а зависит только от пространственной близости между протонами. Другими словами, сила NOE дает информацию о том, насколько близки два протона. Для малых молекул NOE может наблюдаться между протонами, которые находятся на расстоянии до 4 Å, в то время как верхний предел для больших молекул составляет около 5 Å.

Флуктуации поля, возникают при случайном изотропном вращении молекулы в растворе, и обеспечивают механизмы релаксации для спинов с дипольными связями, скорость перехода при частоте ноль, одно- и двухквантовыми переходами составляет[39]:

$$W_k = \zeta_k \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} J(k\omega) \quad (12)$$

где W_k - скорость перехода с нулевого ($k = 0$), одиночного ($k = 1$) или двойного квантования ($k = 2$), $\zeta_0 = 0,1$, $\zeta_1 = 0,15$, $\zeta_2 = 0,6$, Дж ($k\omega$) функция спектральной плотности при $\omega = k \times \omega_s$, а ω_s резонансная частота.

Спектральная плотность для молекулы со случайным изотропным движением:

$$J(\omega) = \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \quad (13)$$

где τ_c - время корреляции вращения или среднее время, за которое молекула поворачивает один радиан. Время ротационной корреляции пропорционально молекулярной массе белка и составляет приблизительно 1 нсек на каждые 2,6 кДа массы.

Рисунок 16 отображает функции спектральной плотности малых и крупных белков. Большой белок обладает высокой спектральной плотностью при $\omega=0$, вращательное движение эффективно при стимулировании нулевых квантовых переходов. Маленький белок имеет функцию спектральной плотности, почти идентична при $\omega = 0$, $\omega = \omega_s$ и при $\omega = 2\omega_s$. Следовательно, все три скорости перехода будут одинаковыми и меньше, чем нулевая скорость перехода для большого белка.

Для получения межпротонных расстояний (r), можно учесть пропорциональность скорости перехода W_k равную $1/r^6$, если вклад от функции спектральной плотности в эту скорость будет оцениваться с некоторой степенью точности.

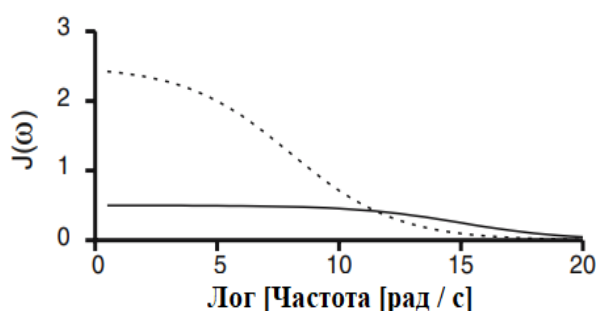


Рисунок 16 – Влияние молекулярной массы на функцию спектральной плотности. На рисунке показаны функции спектральной плотности для небольшого белка (2,6 кДа, сплошная линия) и большого белка (20 кДа, пунктирная линия). Функция спектральной плотности для более крупного белка имеет большую интенсивность на более низких частотах

Путем измерения скорости влияния населенности одного спина на населенность уровней энергии связанного с ним спина, были получены скорости перехода. Генерацию неравновесной совокупности энергетических уровней можно получить и несколькими другими способами. Если рассмотреть ядерный спиновый переход в эксперименте ЯЭО, возникающий из-за непрерывного радиочастотного излучения одной резонансной линии. Благодаря РЧ выравнивается основное возбужденное состояние спина, а также насыщаются одиночные квантовые переходы. Данные о ЯЭО

получают, анализируя влияние насыщения уровней заселенности связанного спина. Недостаток метода связан с возможностью изучения только маленьких молекул, т.к. для больших молекул, из-за перекрывания резонансных линий, невозможно получить нужную информацию. Благодаря введению дополнительных спектральных измерений эти спектры упрощаются, и получается некоторая дополнительная информация.

Облучение спина, связанного одноквантовыми переходами, уравнивают заселенности состояний:

$$n_{\alpha\alpha} = n_{\beta\alpha} \quad n_{\alpha\beta} = n_{\beta\beta} \quad (14)$$

При исследовании крупных белков, к эффективным нулевым квантовым переходам приводит дипольная связь между спинами, при этом уровни заселенности состояний становятся $n_{\beta\alpha} = n_{\alpha\beta}$. Из-за связи со спином I меняется и интенсивность перехода, связанная со спином S (рисунок 17).

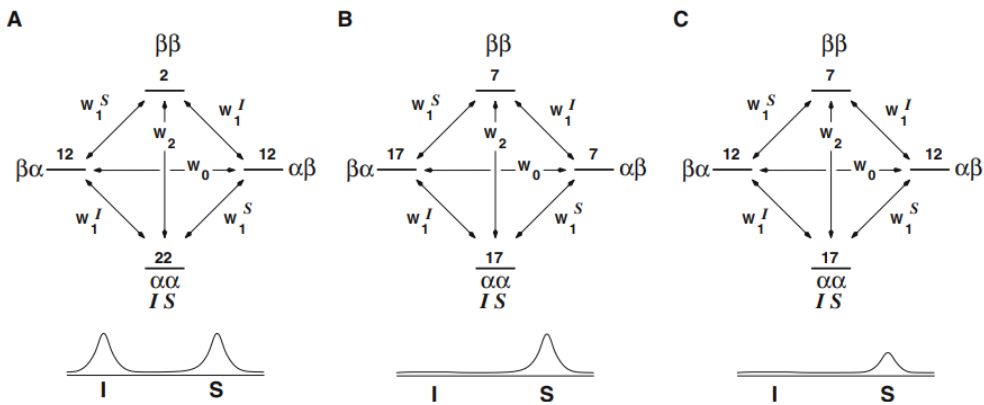


Рисунок 17 – Изменения заселенности ядерных спинов, вызванные дипольным взаимодействием. Верхняя часть рисунка показывает население каждого из четырех состояний. В нижней части рисунка показаны наблюдаемые спектры. А показывает равновесные популяции.

В иллюстрирует эффект насыщения I спинов в отсутствие диполярного взаимодействия. Разность заселенностей на обоих одиночных квантовых I-переходах равна нулю, тогда как заселенность S-спинов не изменяется и все еще равна 20.

С иллюстрирует изменение заселенности S-спинов за счет эффективных нулевых квантовых переходов, которые уравнивают популяции состояний $\beta\alpha$ и $\alpha\beta$

1.8.1 Ошибки в измерении межпротонных расстояний

Первый метод, описанный выше, дает наиболее точные результаты, в то время как последний дает наиболее неточные расстояния. Ошибка межпротонного расстояния, связанная с каждым методом анализа данных, показана на рисунок 18. Анализ матрицы релаксации дает наименьшую ошибку из всех методов (А).

Подгонка данных к экспоненте дает достаточно точные межпротонные расстояния для расстояний менее 2,5 Å (В). Напротив, измерения, которые основаны на единичных временных точках, дают межпротонные расстояния, точность которых существенно уменьшается с увеличением времени смешивания. Если для оценки W_0 используется пиковая интенсивность во время перемешивания 200 мс, то погрешность составляет 15-30% (С). Если используется одна временная точка 400 мсек, то ошибка в расстоянии может превышать 50%, то есть протоны, разделенные на 4,5 Å, выглядят так, как будто они находятся на расстоянии всего лишь 3 Å (D).

За исключением анализа по полной матрице релаксации, все методы дают измеренные экспериментальные расстояния, которые меньше, чем истинное межпротонное расстояние. Или, что-то же самое, кросс-пики более интенсивны, чем должны быть. Этот эффект обусловлен явлением, называемым "спиновой диффузией", которое показано на рис.19. В этом примере спин А и С разнесены на 4,5 Å, поэтому прямая дипольная связь между А и С является слабой. Следовательно, скорость, с которой интенсивность кросс-пика увеличивается со временем смешивания, будет медленной. Тем не менее, спины А и С оба близки к общему спину, В, и намагниченность от спина С может быть эффективно перенесена на спин А, сначала перенеся намагниченность с С на В, а затем с В на А. Этот дополнительный путь для намагничивания передачи увеличит интенсивность кросс-пика между А и С, предполагая, что А и С ближе, чем их фактическое разделение.

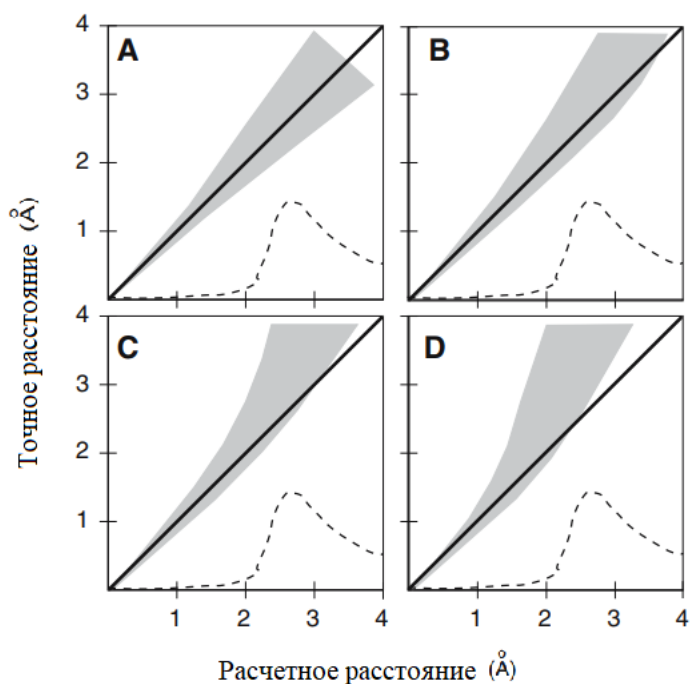


Рисунок 18 – *Ошибки расстояния в измерениях NOESY*. Расстояние, оцененное по кросс-пикам NOESY, строится в зависимости от фактического расстояния между протонами. Пунктирная линия показывает типичное распределение межпротонных расстояний в глобулярных белках. Серая область представляет диапазон ошибок в измеренных расстояниях в типичных экспериментах. Более короткие расстояния дают более интенсивные перекрестные пики, генерируя меньшую ошибку в вычисленном расстоянии. А: Используется полная релаксационная матрица. Ошибка в расстоянии полностью связана с внутренней ошибкой в интенсивности кросс-пика. В: Измерение начальной скорости с использованием одной экспоненциальной подгонки. С: Используется одна временная точка, 200 мсек. D: Используется одна временная точка, время перемешивания 400 мсек

Спиновая диффузия намного более эффективна для крупных белков из-за большого значения $J(\omega)$ при $\omega = 0$.

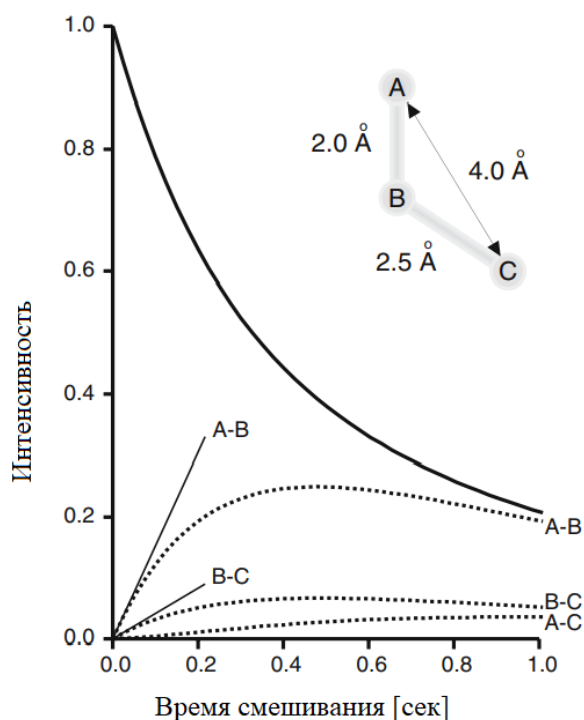


Рисунок 19 – Пиковые *интенсивности* в спектрах *NOESY*. Интенсивности пиков в зависимости от времени перемешивания показаны для собственных пиков (сплошная кривая) и кросс-пиков (пунктир). В этом моделировании протоны А и В были на расстоянии 2 Å, В и С на расстоянии 2,5 Å, а А и С были на расстоянии 4,0 Å, а время спин-решеточной релаксации T_1 было установлено равным 0,5 с. Временной ход каждого из связанных кросс-пиков помечен. Начальные наклоны интенсивностей пиков для кросс-пиков между протонами А и В и между протонами В и С показаны сплошными линиями. Интенсивность кросс-пика между А и С медленно возрастает в ранние моменты времени, но затем возрастает по интенсивности из-за ретрансляции намагниченности через протон В

1.8.2 Эксперименты ^{15}N - ^1H NOESY HSQC и ^{13}C - ^1H NOESY HSQC

Для меченого по ядрам ^{15}N образца регистрировался двумерный гетероядерный спектр: ^{15}N - ^1H HSQC (рисунок 20) и отмечались положения резонансов амидных групп белка. Далее положение этих сигналов использовалось для нахождения резонансов, связанных с ними сигналов ядер основной и боковых цепей белка.

^{15}N -NOESY-HSQC

Намагниченность обменивается между всеми атомами водорода с использованием ЯЭО. Затем намагниченность переносится на соседние ядра ^{15}N и обратно на ^1H для обнаружения. Спектр используется для получения ограничений для структурных расчетов и облегчения распределений для белков малого и среднего размера.

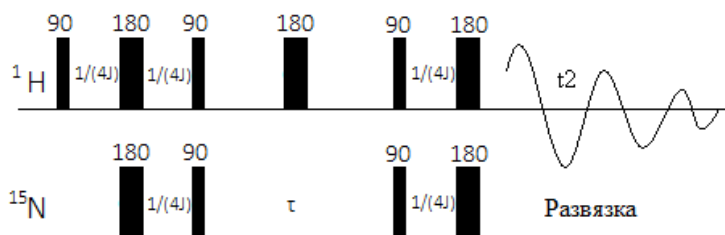


Рисунок 20 – Импульсная последовательность эксперимента HSQC с участием ядер ^1H и ^{15}N [40]

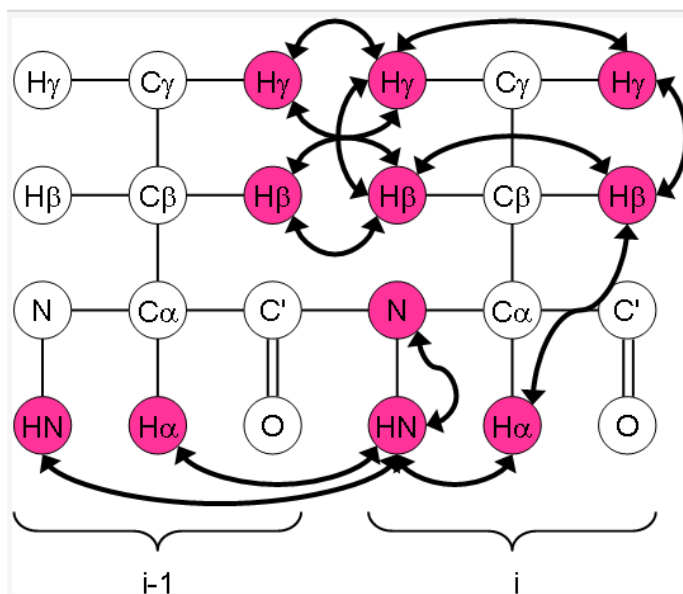


Рисунок 21 – Структура аминокислотной цепи с активными ядрами ЯМР

1.8.3 ^{13}C - ^1H NOESY HSQC

Намагниченность также обменивается между всеми атомами водорода с использованием ЯЭО. Затем намагниченность передается на соседние ядра ^{13}C и обратно на ^1H для обнаружения. Спектр используется для получения ограничений для структурных расчетов и облегчения распределений для белков малого и среднего размера.

^{13}C и обратно в ^1H . Перенос происходит либо на / с алифатических ядер ^{13}C , либо на / с ароматических ядер ^{13}C (но не в двух одновременно) в зависимости от частоты ^{13}C , используемой во время последовательности импульсов.

Этот спектр используется для получения ограничений для структурных расчетов. Обычно он записывается со 100% D_2O в качестве растворителя - это сводит к минимуму артефакты. Может быть сосредоточен или на алифатических, или на ароматических углеродах. Спектр, сосредоточенный на ароматических углеродах, может быть очень полезным для обозначения ароматических остатков.

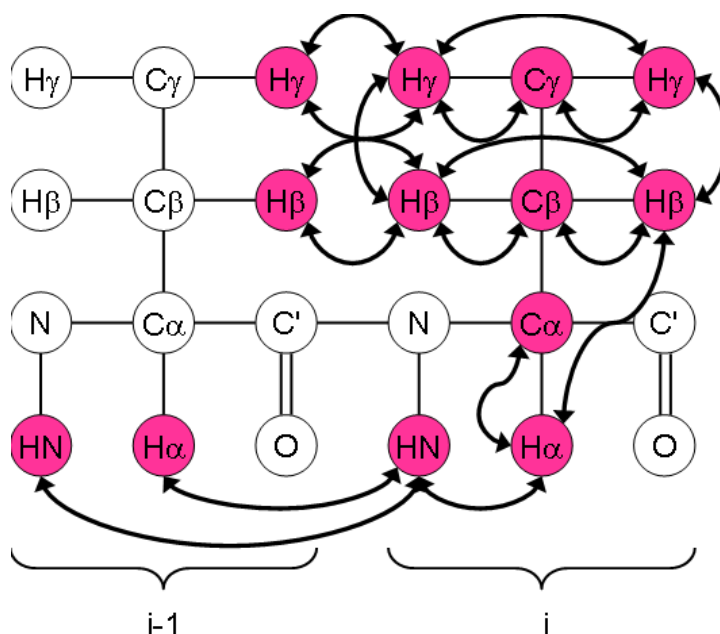


Рисунок 22 – Структура связи аминокислотной цепи с активными ^{13}C ядрами ЯМР

1.8.4 Минимизация энергии и имитация отжига

Структуры уточняются путем сочетания минимизации энергии и имитации отжига. Общая цель состоит в том, чтобы изменить атомные координаты структуры, для получения окончательного набора атомных координат, которые дают самую низкую энергию как для экспериментальных, так и для неэкспериментальных энергетических функций.

1.8.5 Минимизация энергии

Минимальная энергия структуры может быть найдена путем перемещения атомов в направлении, определяемом градиентом энергии:

$$\xi_i = -\frac{\partial E}{\partial x_i} \quad (15)$$

Во время минимизации энергии происходит многократная регулировка атомных координат. Изменение координат на каждом шаге рассчитывается в соответствии с:

$$x'_i = x_i + \xi_i \quad (16)$$

ξ_i пересчитывается после каждого шага в процессе минимизации и уменьшается по мере движения системы к минимуму энергии. Минимизация продолжается либо для заданного числа циклов, либо до тех пор, пока ξ_i не опустится ниже предварительно определенного уровня. Если энергетическая функция является ровной и имеет единый глобальный минимум, то минимизация найдет реальный глобальный минимум и создаст структуру, максимально совместимую с энергетической функцией.

1.8.6 Имитация отжига

Имитация отжига используется для решения проблемы застревания структуры в локальном минимуме энергии. Она имитирует процесс отжига при формировании сплава в металлах. В частности, металл нагревают до высоких температур для облегчения атомных перестроек, а затем охлаждают или отжигают до более стабильных структур. При уточнении моделей атомам в белке дается кинетическая энергия, определяемая температурой системы:

$$\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N m_i v_i^2 = \frac{3}{2} N k_b T \quad (17)$$

Первоначально атомам присваивается случайная скорость, которая зависит от температуры системы [41]:

$$v = \left[\frac{m}{2\pi k_b T} \right]^{3/2} e^{-3m\delta^2/2k_b T} \quad (18)$$

где δ - случайное число от 0 до 1, T - температура системы, k_b - постоянная Больцмана, а m - масса атома.

Поскольку моделирование отжига обычно начинается при высоких температурах, атомы будут иметь высокую кинетическую энергию и смогут преодолевать энергетический барьер между минимумами (рисунок 23). Чтобы обеспечить минимальное сходство системы, температура медленно снижается в конце расчета молекулярной механики. При условии, что температура понижается медленно, система будет отжигать до глобального минимума энергии.

Для заданного набора начальных координат и скоростей x_o и v_o , а также энергии системы координаты в момент времени Δt движение или траекторию рассчитывают с использованием ньютоновской механики с использованием:

$$x' = x_o + v_o \Delta t - \nabla E \frac{\Delta t^2}{2m} \quad (19)$$

где $-\nabla E$ равно силе, приложенной к атомам. E представляет все или подмножество экспериментальных, ковалентных и нековалентных терминов. Шаг по времени, Δt , представляет собой долю от доли секунды, и 50-200 шагов выполняются при любой заданной температуре. Многократные циклы молекулярной механики обычно выполняются с любым конкретным протоколом уточнения. В каждом цикле обычно используются различные

коэффициенты масштабирования энергии, а также ряд других параметров, таких как ван-дер-ваальсовы радиусы атомов.

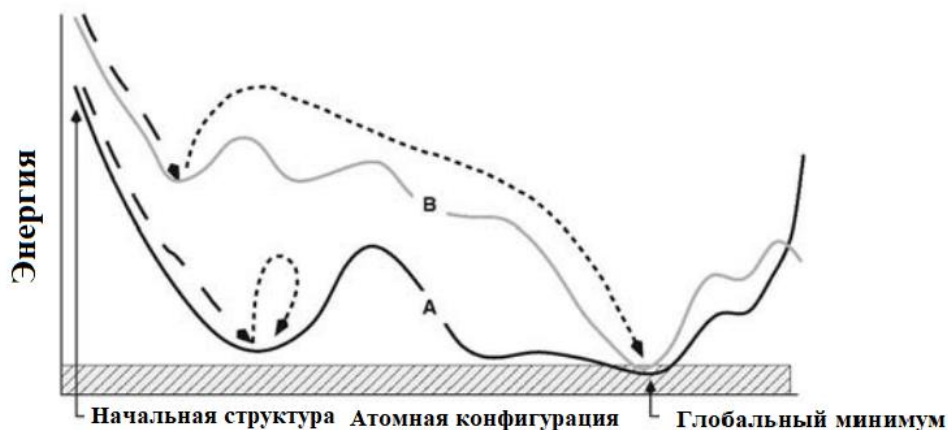


Рисунок 23 – Изменения энергии при моделируемом отжиге. Сплошными линиями показана энергия структуры как функция ее атомных координат. Показаны две пробные структуры, черным (структура **A**) серым (структура **B**). Энергия структур сразу после генерации по геометрии расстояния или по случайным координатам показана в крайнем левом углу графика. Пунктирные линии показывают изменение энергии из-за регуляризации с последующей минимизацией энергии. Обе структуры достигают локального минимума с разумной ковалентной геометрией после регуляризации. Пунктирные линии показывают изменения в энергии, которые происходят во время дополнительного измельчения путем имитации отжига. В случае структуры **B** (серая) энергетические барьеры между каждым локальным минимумом могут быть преодолены из-за высокой кинетической энергии атомов во время отжига, таким образом, **B** в конечном итоге находит глобальный минимум в энергии. Энергетические барьеры, окружающие локальный минимум для структуры **A**, слишком высоки, поэтому структура **A** находится на локальном минимуме после уточнения. Серая пунктирная область указывает диапазон энергий, которые считаются приемлемыми после уточнения; только очень небольшое подмножество всех возможных атомных конфигураций обладает указанным диапазоном энергий

2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦА БЕЛКА ДЛЯ СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР

Экспрессия белка С-домена SaHPF проводилась в клеточной системе бактериального штамма *E.Coli*, клетки, с трансформированной плазмидой конструкции pGS21A.

Немеченый образец получили путем посева бактериальных клеток *E.Coli* в приготовленную твердую питательную среду LB с добавлением в неё ампициллина с концентрацией 100 мкг/мл. Чашки инкубировали при температуре 37°C в течение 12 часов.

2.1 Приготовление образцов для спектроскопии ЯМР

Для получения белка, меченного стабильными изотопами ^{15}N и ^{13}C синтезированного клетками *E.coli*, содержащими плазмиду pGS21A с вставкой SaHPF, из одиночных колоний на среде LB, изымалась одна часть с чашки и переносилась в минимальную синтетическую среду (M9). Среда имела состав: Глюкозу - ^{13}C (2 г/л), MgSO_4 1M (1 мл), CaCl_2 1M (0.3 мл), D-biotine 10 мг/мл (0.1 мл), Thiamin 10 мг/мл (1 мл) M9 Trace elements solutions (10 мл), M9 Salt x 10 (в составе имеется $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$) (100 мл), ампициллин 100 мг/мл (1 мл), высокоочищенная вода (доводили объем до 1 л). Для меченного по ^{15}N белка, в качестве источника азота использовали сульфат аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 г/л). Для получения меченного образца по ^{13}C , в качестве углерода использовалась глюкоза $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (3 г/л).

Клетки росли при температуре 37°C в течении суток. Культура высевалась в 1-2 л минимальной среды для дальнейшего наращивания необходимого количества клеток. Индуцировался образец с раствором 1M IPTG (0,5 мл на литр), до концентрации 0.5 mM в течении суток.

После, клетки *E.Coli* осаждали путем центрифугирования в течение 10 минут при 4°C в роторе JLA 8.100. Затем осаждались и промывались в “cell resuspension buffer”, для переноса в пробирки типа фалькон объемом 50мл,

далее производилось центрифугирование и осаждение клеток. Осажденные клетки хранились при -20 °С.

2.2 Этапы выделения белка SaHPF из клеток *E.Coli*.

Взятые из морозильной камеры клетки *E.Coli* в объеме 4 г растворялись в 10 мл “cell resuspension buffer”. К раствору добавляли 0,4 мл ингибитора протеаз, DNase RNase-Free и PMSF. Для сохранности клеток весь этап работы проводился на льду.

Далее клетки лизировались, под УЗ 3 раза по три минуты каждый цикл и полученный клеточный лизат переносился в две чистые пробирки для центрифугирования объемом 30 мл. После получения клеточного дебриса при центрифугировании при 25000g в течение 30 минут на роторе “JA 25.50” при 4°C на центрифуге BECKMAN Avanti J-25, проводилось осаждение клеток. Затем, отбирался супернатант в пробирки для центрифуги “Ti 45”, по 25 мл.

Повторялась процедура центрифугирования для осаждения на ультрацентрифуге BECK-MAN COULTER при 45000 об/мин в течение 45 мин. на роторе “Ti 45” при 4°C. И вновь отбирался супернатант без примеси осадка. В последствии работа продолжалась с конечным полученным супернатантом.

2.3 Очистка белка SaHPF на колонке со смолой Ni-NTA Superflow

Очистка проходила в два этапа: методом аффинной хроматографии на и эксклюзионной хроматографии.

С помощью “cell resuspension buffer” промывалась колонка от спирта, 5 кратным объемом (20 мл). Поэтапно в неё вносился супернатант в колонку.

Промыв смолы проходил с использованием растворов:

40 мл (10 кратный объем) Wash Buffer “A” – High Salt – T₂₀N₁₀₀₀

40 мл (10 кратный объем) Wash Buffer “B” – Low Imidazole – T₂₀N₅₀₀I₂₀

Далее вносилось 15 мл Elution Buffer, и некоторое время ожидалось проникание раствора в смолу (2 мл), затем инкубирование 15 минут. Фракции набирались в объеме 0,5 мл, затем вновь инкубировали, и собирали фракции.

2.4 Осаждение белка в растворе

1 мл раствора белка смешивали с 0,50 г соль аммония сульфата. После ночи, с помощью центрифугирования при 20000g в течение 30 мин при 4°C осаждался осадок в растворе белка с аммонием сульфатом.

После центрифугирования, отбирался супернатант

2.5 Конечная стадия очистки белка SaHPF на гель-фильтрационной колонке Superdex 75 10/300

В уравновешенную колонку буфером Running Buffer с помощью шприца вносился раствор белка в объеме 0,5 мл на колонку. Колонка элюировалась и собрались фракции по 300 мкл и измерялась итоговая концентрация белка.

Немеченый белок рос в среде LB. Дальнейшая работа ничем не отличалась, как в случае с получением меченного белка.

Полученные образцы были собраны в аликвоты, объемы и концентрации которых зависели от условий нужного нам ЯМР эксперимента (поэтапный протокол проведения экспрессии белка рассмотрен в методическом пособии).

2.6 Электрофорез белка

Чистоту выделенного белка анализировали с помощью гель электрофореза. Гель электрофорез – используется для распределения

макромолекул в соответствии с их различиями в размерах. Для выполнения работы использовалась камера для электрофореза и гель.

Для работы использовался 1 х ТБЭ с добавлением агароза в количестве, 0,35—0,45% (в/о). К раствору агарозы добавлялся бромистый этидий до конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Теплая агароза равномерно распределялась по кювете и оставлялась до момента застывания.

Кювету с застывшим гелем помещали в электрофорезную камеру, содержащую необходимое количество 1 х ТБЭ с бромистым этидием в конечной концентрации 0,5 мкг/мл.

Подготовленные к электрофорезу образцы выделенного белка, содержащего 60 аминокислот, и маркерную ДНК, наносили на гель в буфере. Для получения четкого сигнала при окрашивании бромистым этидием-EtBr, в лунку вносился около 200 нг маркерной ДНК и исследуемый белок. Электрофорез проводился при градиенте напряженности 1—3В на 1 см геля в течение 3 ч.

После гель окрашивался раствором кумаси и визуализировался в УФ-свете на транс иллюминаторе (сфотографированный результат рисунок 24).

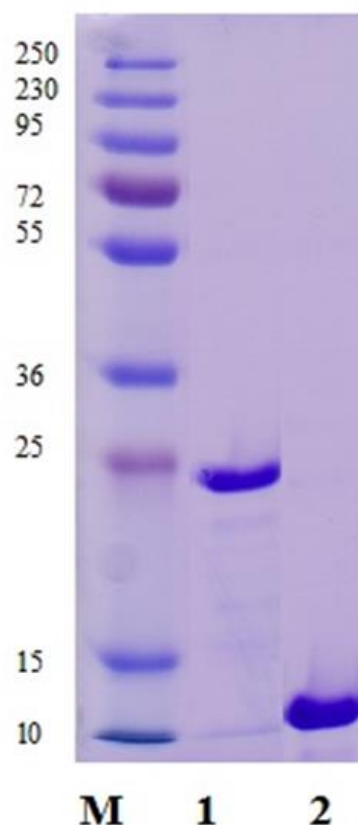


Рисунок 24 – Электрофоретический анализ фракций белков SaHPF и Δ SaHPF в полиакриламидном геле. М - маркеры молекулярной массы (слева приведена масса соответствующих полос в кДа),

1) Исходный SaHPF (22.2 кДа), 2) Δ SaHPF С-концевой домен (7.9 кДа)

Результат электрофоретического анализа показывает степень чистоты выделенного и очищенного белка: в лунке один белок SaHPF напротив массы молекулярных весов равный 25 кДа; в лунке два С-концевой домен белка SaHPF напротив массы молекулярных весов 10 кДа (наименьшая масса в данном маркере молекулярных весов). Белок наносился в избытке для детекции примеси в очищенном образце. Несоответствие массы С-концевого домена белка SaHPF массе молекулярных весов объясняется особенностью движения данного (небольшого) белка в полиакриламидном геле. Степень чистоты белка в данном ряду экспериментов позволяет его использовать для биохимических и структурных (ЯМР, рентгеноструктурного анализа, крио-ЭМ) экспериментов.

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Регистрация спектров ЯМР проводилась на спектрометре Avance III HDТМ фирмы Bruker с частотой 700 МГц по протонам, оснащенным четырехканальным ($^1\text{H}/^{19}\text{F}$, ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P) криодатчиком QCI.

Образец для ЯМР исследований содержал 2 мМ меченного по изотопам $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ белка SaHPF-CTD в растворе фосфатного буфера (90% H_2O + 10% D_2O), содержащем 250мМ соли NH_4Cl (pH = 7.6).

Обработка спектров проводили в программе CCPNMR. Отнесение сигналов ядер ^1H , ^{13}C , и ^{15}N основной и боковых цепей белка в спектрах ЯМР проводилось на основе многомерных экспериментов ЯМР CBCANH, CBCA(CO)NH, HNCA, HN(CO)CA, HNCO, HN(CA)CO, C(CO)NH, H(CCO)NH. Межпротонные расстояния определяли из спектров 2D ^1H - ^1H NOESY, 3D ^1H - ^{15}N NOESY-HSQC и 3D ^1H - ^{13}C NOESY-HSQC. Значение двугранных углов ϕ и ψ поучали по данным химических сдвигов в программе DANGLE.

Расчет пространственной структуры белка по экспериментальным данным ЯМР осуществлялся в программе CNS (Crystallography and NMR System) с модулем ARIA (Ambiguous Restraints for Iterative Assignment) [42] методом молекулярной динамики и алгоритмом симулированного отжига. Расчет структуры молекулы белка проводился в вакууме с помощью стандартного протокола CNS, затем проводилась оптимизация полученных структур с помощью расчета короткой траектории в водном окружении с использованием потенциала электростатических взаимодействий. Качество получаемых структур оценивалось исходя из анализа нарушений ограничений и карты Рамачандрана.

3.1 Эксперименты ^{15}N - ^1H HSQC

Для меченого по изотопам ^{15}N и ^{13}C С-концевого домена белка SaHPF регистрировались двумерные гетероядерные спектры: ^{15}N - ^1H HSQC (рисунок 25).

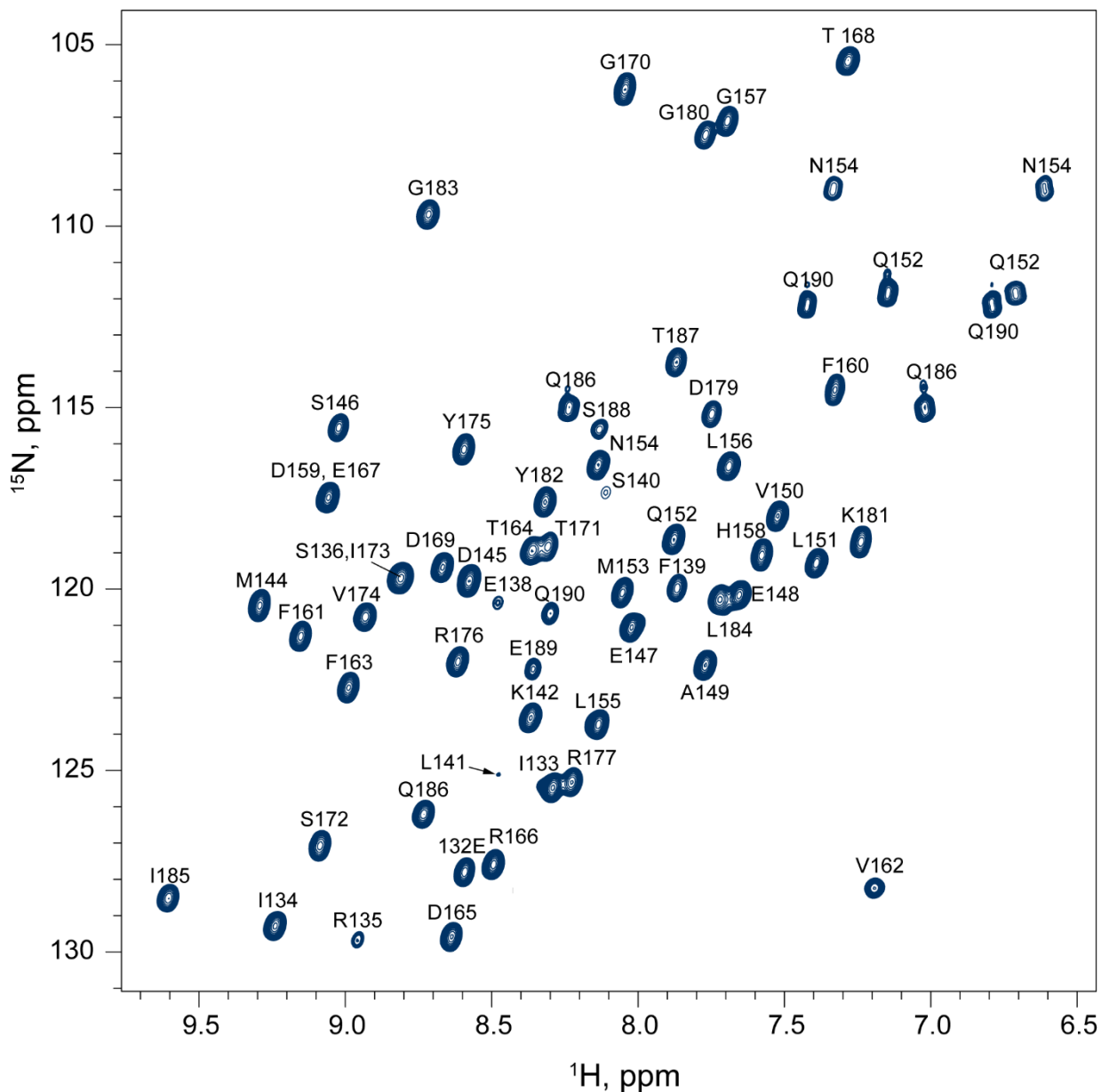


Рисунок 25 - Спектр [^1H , ^{15}N]-HSQC для С-домена белка SaHPF

Анализируя дисперсии сигналов в спектре, пришли к выводу, об упорядоченности структуры белка. Для подавления сигнала растворителя (воды) использовалась импульсная последовательность WATERGATE [43].

3.2 Отнесение сигналов в спектрах ЯМР

Для меченого образца белка записывали серию трехмерных спектров ЯМР: HNCA, HN(CO)CA, HNCО, HNCACB, CBCA(CO)NH (рисунок 29).

Для преобразования и интерпретации полученных многомерных спектров ЯМР использовалась программа CcpNmr Analysis (<http://www.ccpn.ac.uk/v2-software/software/analysis>).

Химических сдвиги атомов белка находились путем соотношения пиков в спектрах белка. Отнесение пиков заключалось в последовательном соотношении сигналов атомов основной цепи белка. Изначально определяли центры пиков в спектре ^{15}N - ^1H HSQC, и далее использовали их положение для нахождения сигналов связанных с ними ядер в трехмерных экспериментах.

Путем переноса намагниченности по непрямоу спин-спиновому взаимодействию через одну или две химические связи. было проведено соотношение сигналов для основной цепи. Для этого были использованы 2D и 3D спектры ЯМР: [^1H , ^{15}N]- HSQC, HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, CBCA(CO)NH в программе CcpNmr Analysis.

Эксперименты HNCA - HN(CO)CA и HNCACB - CBCA(CO)NH. HNCA и HNCACB – позволили определить связанные друг с другом атомы в полипептидной цепи: HN, N, и C^α (C^α и C^β для HNCACB) собственного и предыдущего аминокислотных остатков, а эксперименты HN(CO)CA и CBCA(CO)NH – дали информацию только о предыдущем аминокислотном остатке. Комбинируя данные всех шести экспериментов возможно идентифицировать сигналы от каждого из аминокислотных остатков.

Аминокислотная последовательность исследуемого белка:

**M IEIIRSKEFS LKPMDS EAV LQMNL LGHDF FVFTDRET DG
TSIVYRRKDG KYGLIQTSEQ ННННН**

Последовательное отнесение сигналов для собственных и предыдущих остатков поводило определить цепочку связанных в полипептидной цепи

остатков и по характерным химическим сдвигам сигналов C^β остатков Thr, Ser и Ala были сопоставлены данные остатки конкретным остатком из белковой последовательности (рисунок 26).

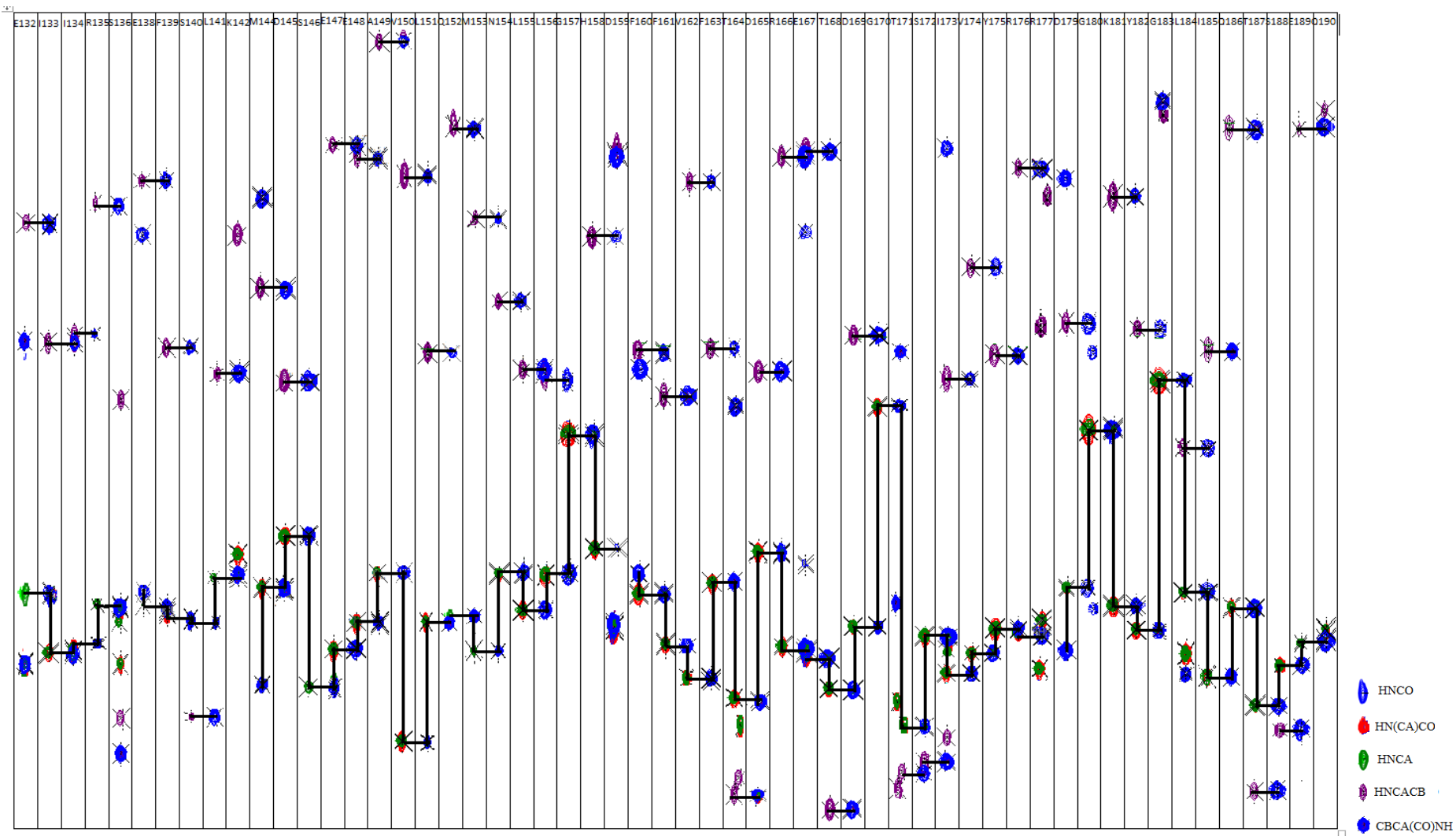


Рисунок 26 – Последовательное отнесение сигналов по ядрам ^1H , ^{13}C , ^{15}N основной цепи исследуемого белка в экспериментах (HNCA и HN(CO)CA белка C-домена фактора терминации трансляции SaHPF (для работы со спектрами использовалась программа CcpNmr Analysis))

На основе отклонений положения сигналов ЯМР для ядер $^1\text{H}^\alpha$, $^{13}\text{C}^\alpha$, $^{13}\text{C}'$, $^{13}\text{C}^\beta$ от средних значений был рассчитан индекс химического сдвига (рисунок 27) [44], рассчитаны значения 114 двугранных углов и определено положение элементов вторичной структуры белка: β_1 (133-135 остаток), α (146-156 остаток), β_2 (160-164 остаток), β_3 (171-175 остаток), β_4 (182-187 остаток). На основе полученных данных о химических сдвигах, данных 2D ^1H - ^1H NOESY спектра для белка SaHPF-CTD с природным содержанием изотопов в 100% D_2O и данных 3D ^{15}N NOESY-HSQC (время смешивания 150 мс) и ^{13}C NOESY-HSQC (время смешивания 200 мс) спектров ЯМР для белка SaHPF-CTD меченного по изотопам ^{15}N и $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$, была получена информация о межъядерных ЯЭО контактах, двугранных углах, и водородных связях. Из спектров ядерного эффекта Оверхаузера (NOESY), получили 2639 межъядерных расстояний, которые вместе с данными о двугранных углах использовались в качестве входных данных для расчета пространственной структуры белка методом молекулярной динамики (Таблица 2).

Таблица 2 – Статистика ЯМР ансамбля из структур с низкой энергией, получаемая от начальных структур

| | |
|--|------|
| Общее число ЯЭО контактов | 2639 |
| Дальнего диапазона ($i-j > 4$) | 723 |
| Среднего диапазона ($i-j = 2,3,4$) | 358 |
| Короткого диапазона ($i-j = 1$) | 446 |
| Внутри остаточные контакты ($i = 0$) | 1112 |
| Водородные связи | 108 |
| Двугранные углы | 114 |



Рисунок 27 – Межпротонные контакты ЯЭО и индексы химического сдвига (CSI) для аминокислотных остатков белка SaHPF-CTD. Положение элементов вторичной структуры белка показаны лентой для α -спирали и стрелками для β -нитей

Было рассчитаны 300 структур и отобраны 10 с минимальной энергией (рисунок 28). Среднеквадратичное расстояние положений атомов основной цепи белка для ансамбля составляло 0.318 \AA .

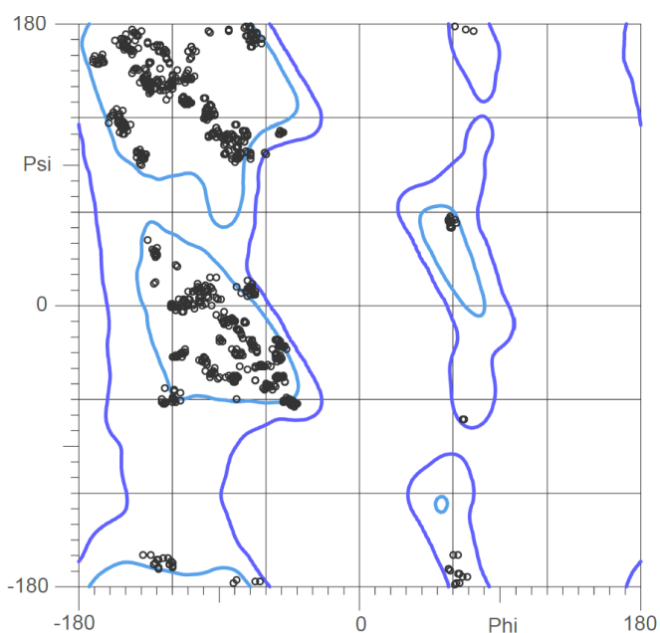


Рисунок 28 – Значение двугранных углов ансамбля 10 структур С-концевого домена белка SaHPF определенных по данным спектроскопии ЯМР

Качество получаемых структур оценивалось исходя из анализа нарушений ограничений и карты Рамачандрана, 89,5% углов находилось в наиболее предпочтительных областях карты и 100% в разрешенных областях карты.

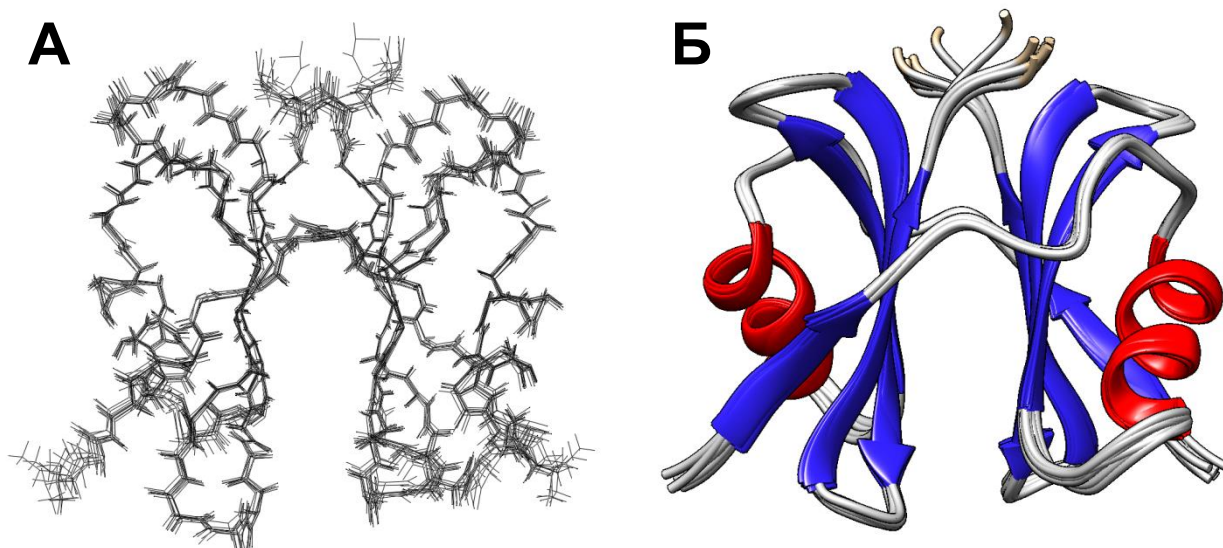


Рисунок 29 – Семейство из 10 структур (А) и репрезентативная модель (Б) С-концевого домена бека SaHPF определенная по данным спектроскопии ЯМР

Таким образом методом спектроскопии ЯМР высокого разрешения было показано, что структура С-концевого домена белка SaHPF состоит из одной α -спирали и четырех β -листов (топология $\beta_1-\alpha_1-\beta_2-\beta_3-\beta_4$), а также, что С-концевой домен белка SaHPF присутствует в растворе в виде гомодимера.

Заключение

В результате проделанной работы были получены следующие результаты:

-Найдены подходящие условия экспрессии белка для исследования методом спектроскопии ЯМР.

-Спектры, полученные в ходе работы, были обработаны и проведено отнесение сигналов ЯМР ядер ^1H , ^{13}C и ^{15}N аминокислотных остатков из основной белковой цепи С-домена белка SaHPF. Показано, что в структуре С-домена белка в растворе присутствуют элементы вторичной структуры в виде β -складки: β_1 (133-135 остаток), β_2 (160-164 остаток), β_3 (171-175 остаток), β_4 (182-187 остаток) и α -спирали (146-156 остаток).

- На основе полученных данных о химических сдвигах, данных 2D ^1H - ^1H NOESY спектра, 3D ^{15}N NOESY-HSQC (время смешивания 150 мс) и ^{13}C NOESY-HSQC (время смешивания 200 мс) спектров ЯМР для белка SaHPF-STD меченного по изотопам ^{15}N и $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$, была получена информация о межъядерных ЯЭО контактах, двугранных углах, и водородных связях и рассчитана структура белка методом молекулярной динамики.

- Показано, что структура С-концевого домена белка SaHPF состоит из одной α -спирали и четырех β -листов (топология β_1 - α_1 - β_2 - β_3 - β_4), а также, что С-концевой домен белка SaHPF присутствует в растворе в виде гомодимера.

Библиографический список

1. Blokhin, D. NOE Effect of Sodium Dodecyl Sulfate in Monomeric and Micellar Systems by NMR Spectroscopy [Text] / D. Blokhin, E.A. Filippova, V.V. Klochkov // Applied Magnetic Resonance. – 2014. – V. 15. – P. 715-721.
2. Аюпов Р.Х., Выделение и очистка белка для исследования методом ЯМР [Текст] / Р.Х. Аюпов, К.С. Усачев - Учебно-методическое пособие. Рецензент: Д.х.н. Аганов А.В./ Казан. ун-т. - 2016. – 4 с.
3. Polikanov, Y. How Hibernation Factors RMF, HPF, and YfiA Turn Off / Y. Polikanov, G. Blaha, Th. Steitz [Text] // Protein Synthesis. Science. - 2012, Vol. 336. - P. 915-918.
4. Ueta, M. Formation of 100S ribosomes in Staphylococcus aureus by the hibernation promoting factor homolog SaHPF [Text] / M. Ueta, Ch. Wada, A. Wada // Genes to Cells. - 2010. - Vol. 15. - P. 43-58.
5. Ayupov, R.K. Prediction of the threedimensional structure of the protein SaHPF and analysis of its molecular dynamics [Text] / R.K. Ayupov, N.I. Akberova, M.M. Yusupov // International journal of Pharmacy and Technology. – 2016.
6. Yang, J. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction [Text] / J. Yang, R. Yan, A. Roy, D. Xu // Nature Methods. – 2015. – V. 12. – P. 7-8.
7. Raman, S. Structure prediction for CASP8 with all-atom refinement using Rosetta [Text] / S. Raman, R. Vernon, J. Thompson // Proteins. – 2009. – V. 77. – P. 89-99.

8. Xu, D. Ab initio protein structure assembly using continuous structure fragments and optimized knowledge-based force field [Text] / D. Xu, Y. Zhang // Proteins. – 2012. – V. 80. – P. 1715-1735.
9. Ayupov, R.K. Molecular dynamics of the pyridoxine derivative in the acetylcholinesterase active cavity [Text] / R.K. Ayupov, N.I. Akberova // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2015. – V. 6, No 6. – P. 1717-1722.
10. Ayupov, R.K. The ligand behavior on the surface of acetylcholinesterase [Text] / R.K. Ayupov, N.I. Akberova // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2015. – V. 6, No 4. – P. 2202-2206.
11. Аюпов, Р.Х. Анализ структуры белка SaHPPF Staphylococcus aureus [Текст] / Р.Х. Аюпов, Н.И. Акберова // Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки. – 2016. – Т. 158. – С. 327-33.
12. Neidhardt, F.C. Hengge-Aronis, R.. Regulation of gene expression during entry into stationary phase [Text] / F.C. Neidhardt, R. Curtiss, J.L. Ingraham // Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology. - 1996. - P. 1497–1512.
13. Wada, A. Structure and probable genetic location of a “ribosome modulation factor” associated with 100S ribosomes in stationary-phase Escherichia coli cells [Text] / A. Wada, Y. Yamazaki, N. Fujita // Proc. Natl Acad. Sci. -1990. -V. 87. P. 2657–2661.
14. Izutsu, K. Escherichia coli ribosome-associated protein SRA, whose copy number increases during stationary phase [Text] / K. Izutsu, C. Wada, Y. Komine // J. Bacteriol. - 2001. V. 183, P. 2765–2773.

15. Maki, Y. Two proteins, YfiA and YhbH, associated with resting ribosomes in stationary phase *Escherichia coli* [Text] / Y. Maki, H. Yoshida, A. Wada // *Genes Cells* 5. - 2000. - P. 965–974.
16. Yamagishi, M. Regulation of *Escherichia coli* *rmf* gene encoding the ribosome modulation factor: growth phase- and growth rate-dependent control [Text] / M. Yamagishi, H. Matsushima, A. Wada // *EMBO J.* -1993. - V. 12. - P. 625–630.
17. Ueta, M. Ribosome binding proteins YfiA and YhbH have opposite functions during 100S formation in the stationary phase of *Escherichia coli* [Text] / M. Ueta, H. Yoshida, C. Wada // *Genes Cells.* -2005. -V. 10. - P. 1103–111.
18. Ueta, M. Role of HPF (Hibernation Promoting Factor) in translational activity in *Escherichia coli* [Text] / M. Ueta, R.L. Ohniwa, H. Yoshida // *J. Biochem.* -2008. -V. 143. - P. 425–433.
19. Yoshida, H. Activities of *Escherichia coli* ribosomes in IF3 and RMF change to prepare 100S ribosome formation on entering the stationary growth phase [Text] / H. Yoshida, M. Ueta, Y. Maki // *Genes Cells.* - 2009. -V. 14. - P. 271–280.
20. Yoshida, H. The ribosome modulation factor (RMF) binding site on the 100S ribosome of *Escherichia coli* [Text] / H. Yoshida, Y. Maki, H. Kato // *J. Biochem.* -2002. -V. 132. P. 983–989.
21. *Genes to Cells.* 2010. Vol. 15, [Text]. P. 43-58.
22. Holm L. Mapping the protein universe [Text] / L. Holm, C. Sander // *Science.* -1996. -V. 273. -P. 595–603.

23. Rak, A. Solution structure of the ribosome-associated cold shock response protein Yfia of Escherichia coli [Text] / A. Rak, A. Kalinin, D. Shcherbakov, P. Bayer // Biochem. Biophys. Res. Commun.-2002. -V. 299. -P. 710–714.
24. Ye, K. Ribosome-associated factor Yadopts a fold resembling a double-stranded RNA binding domain scaffold [Text] / K. Ye, A. Serganov, W. Hu, M. Garber, D.J. Patel // Eur.J. Biochem.. - 2002. -V. 269. -P. 5182–5191.
25. Аюпов, Р.К. Prediction of the three-dimensional structure of the protein SaHPF and analysis of its molecular dynamics [Text] / Аюпов Р.К., Акберова Н.И. // Int. J. Pharm. Technol.. - 2016. - V. 8. -P. 14548-1455.
26. Аюпов, Р.Х. Анализ структуры белка SaHPF Staphylococcus aureus [Текст] / Р.Х. Аюпов, Н.И. Акберова // Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки. – 2016. – Т. 158 – С. 327-337.
27. Основные принципы магнитного резонанса [Электронный ресурс] /. — Электрон. текстовые дан. — Режим доступа: <https://www.kazedu.kz/referat/160424>, свободный.
28. Bax, A. ¹H and ¹³C assignment from sensitivity enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by two-dimensional multiple quantum NMR [Text] / A. Bax, M.F. Summers // J. Am. Chem. Soc. – 1986. – V. 108. – P. 2093-2094.
29. Teng, Q. Structural Biology: Practical NMR Applications [Text] / Q. Teng // Department of Chemistry University of Georgia Athens, Georgia. – 2005. - V.5. – P. 163-178.
30. Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy. Electronic resource [Text] /. — Электрон. текстовые дан. — Режим доступа: https://www.wikiwand.com/en/Heteronuclear_single_quantum_coherence_spectroscopy, свободный. — From Wikipedia, the free encyclopedia.

31. Go to Biotool 3D HNCO. Electronic resource [Text] / Teodor Parella. — Электрон. текстовые дан. — Режим доступа: <http://rmni.iqfr.csic.es/guide/eNMR/eNMR3Dprot/hnco.html>, свободный.
32. Teng, Q. Structural Biology: Practical NMR Applications [Text] / Q. Teng // Springer Science & Business Media. — 2007. — V. 295. - P.169.
33. D Triple-Resonance 3D HN(CO)CA. Electronic resource [Text] / Teodor Parella. — Электрон. текстовые дан. — Режим доступа: [http://rmni.iqfr.csic.es/guide/eNMR/eNMR3Dprot/hn\(co\)ca.html](http://rmni.iqfr.csic.es/guide/eNMR/eNMR3Dprot/hn(co)ca.html), свободный.
34. Teng, Q. Structural Biology: Practical NMR Applications [Text] / Q. Teng // Springer Science & Business Media. — 2007. — V. 295. - P.169-170.
35. Teng, Q. Structural Biology: Practical NMR Applications [Text] / Q. Teng // Springer Science & Business Media. — 2007. — V. 295. - P.176-177.
36. 3D Triple-Resonance 3D HN(CO)CA. Electronic resource [Text] / Victoria A. Higman. — Электрон. журн. — 2012. — Режим доступа: <http://www.protein-nmr.org.uk/solution-nmr/spectrum-descriptions/cbcaconh-hncocacb/>, свободный.
37. Экспериментальные методы химической кинетики [Text] / Под ред. Н.М.Эмануэля и М.Г.Кузьмина. — Учеб. пособие. — МГУ: 1985. — 375с.
38. Хауссер, К.Х. ЯМР в медицине и биологии структура молекул, топография, спектроскопия in-vivo [Text] / К.Х. Хауссер, Х.Р. Кальбитцер / под ред. доктора физ.-мат.наук С.М.Рябченко, пер. с нем. З.З.Рожковой // — Наукова думка, 1993. — 269с.
39. Rule, G.S. Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy [Text] / G.S. Rule, T.T. Hitchens // Dordrecht: Spriger, - 2006. — P.530.

40. 2D NMR Introduction. Electronic resource [Text] / MM UC- Davis. — Электрон. журн. — 2019. — Режим доступа: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Spectroscopy/Magnetic_Resonance_Spectroscopies/Nuclear_Magnetic_Resonance/NMR%3A_Experimental/2D_NMR/2D_NMR_Introduction](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Magnetic_Resonance_Spectroscopies/Nuclear_Magnetic_Resonance/NMR%3A_Experimental/2D_NMR/2D_NMR_Introduction), свободный.
41. Solomon I. Relaxation processes in a system of two spins. Physical Review [Text] / I. Solomon // University of Toronto. – 1955. – P.559– 565.
42. Neuhaus D. The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis [Text] / D. Neuhaus and M. Williamson // VCH Publishers, Inc., New York, – 2000. – P. 656.
43. Piotto M. Gradient-tailored Excitation for Single-quantum NMR Spectroscopy of Aqueous Solutions [Text] / Piotto, M., Saudek, V., and Sklenar, V. // J. Biomol. NMR 2. – 1992. – P. 661.
44. Berjanskii M.VA, Simple method to predict protein flexibility using secondary chemical shifts [Text] / Berjanskii M.V, Wishart D.S. // Journal of the American Chemical Society, V.127 (43), – 2005. – P. 14970 -14971.