

ОБЗОРЫ АКТУАЛЬНЫХ ПРОБЛЕМ

Обменная ЯМР спектроскопия твердого тела: применение для изучения крупномасштабной конформационной динамики биополимеров

А.Г. Крушельницкий

Обменный ЯМР эксперимент основан на сравнении резонансной частоты магнитного ядра до и после так называемого времени смешивания, что дает информацию о молекулярной динамике в миллисекундном и секундном диапазонах времен корреляции. Хотя в растворах обменные ЯМР эксперименты используются уже долгое время, в твердых телах их применение было ограничено рядом методических проблем. Только к концу 90-х годов XX века развитие методики твердотельной обменной спектроскопии позволило использовать этот тип экспериментов для исследования таких сложных объектов, как биополимеры. В данном обзоре описываются основные методические достижения в области обменной ЯМР спектроскопии твердого тела и применение обменных ЯМР экспериментов для изучения конформационной молекулярной динамики различных биополимеров в твердом состоянии.

PACS numbers: 76.60.-k, 82.56.-b, 82.56.Pp

Содержание

1. Введение (815).
2. Методика обменных экспериментов (817).
3. Применение обменных твердотельных экспериментов для исследования динамики белков (824).
4. Заключение (830).

Список литературы (831).

1. Введение

За последние несколько десятилетий белки стали одним из наиболее популярных (если не сказать самым популярным) биологическим объектом, который интенсивно изучается разнообразными физическими методами. Одна из основных целей исследования белков — это изучение молекулярных механизмов их биологического функционирования. Кроме чисто фундаментального интереса, эти исследования также имеют и практическое значение: если знать, каким именно образом белок осуществляет свою функцию (ферментативную, ингибиторную, транспортную, механо-химическую и т.п.), его можно модифицировать или придать ему новые свойства, что очень важно для биотехнологии и медицины.

А.Г. Крушельницкий, Казанский институт биохимии и биофизики РАН, 420111 Казань, ул. Лобачевского 2/31, Российская Федерация
Тел. (8432) 31-90-37
Факс (8432) 92-73-47
E-mail: krushelnitsky@mail.knc.ru

Статья поступила 8 декабря 2004 г.

Хотя и достаточно условно, работы по изучению механизмов функционирования белков можно разделить на два взаимосвязанных направления. Одно из них — это структурные исследования, другое — изучение конформационной динамики белков. К настоящему времени не подвергается сомнению, что оба эти фактора крайне важны для понимания молекулярных основ биологической работы белков. Исторически сложилось так, что структурные исследования белков начались гораздо раньше, и в этой области науки сделано намного больше, чем в исследованиях по молекулярной динамике. Начальный толчок развитию структурных исследований дала первая расшифровка пространственной структуры глобулярного белка, гемоглобина, методом рентгеноструктурного анализа [1], за что в 1962 г. Макс Перутц получил Нобелевскую премию. За прошедшее с тех пор время этим методом расшифровано уже много тысяч структур различных белков. Второй всплеск интереса к структурным исследованиям белков пришелся на конец 80-х — 90-е годы прошлого столетия. Он связан с развитием другого мощного метода определения структуры белков — многомерного и мультиядерного ЯМР высокого разрешения в растворах [2]. За эти работы тоже была присуждена Нобелевская премия, которую в 2002 г. получил швейцарец Курт Вютрих.

Несмотря на то, что знание пространственного строения полипептидной цепи открывает путь к пониманию очень многих свойств белка, почти сразу же стало ясно, что одной только этой информации недостаточно для полного детального объяснения механизма функционирования белка на молекулярном уровне. Это можно продемонстрировать на примере того же самого гемоглобина. Его биологическая функция состоит в транс-

портировке кислорода в кровь. Молекула кислорода связывается в активном центре белка, геме, и таким образом переносится в нужное место. Однако детальный анализ пространственной структуры показывает, что щель, соединяющая гем с поверхностью белка, очень узка для молекулы кислорода, и для того, чтобы она сквозь нее "протиснулась", необходимо предположить, что структура белка подвижна. В те моменты, когда щель приоткрывается, гем становится стерически доступным, и тогда возможно связывание белка с молекулой кислорода. Детально роль молекулярной динамики в биологическом функционировании гемоглобина была рассмотрена в серии работ Мартина Карплюса (см. обзор [3] и ссылки в этой работе).

Это один из самых простейших и очевидных, но далеко не самый исчерпывающий пример важности динамики для биологической функции. Кроме регуляции доступа лиганда к белку, конформационная подвижность может играть существенную роль в молекулярном распознавании, как, например, в барстаре [4, 5] или триптофан-репрессоре [6], а также в других биологических процессах. Молекулярным механизмом вовлечения динамики в биологическую функцию посвящен ряд последних обзоров по динамике белков [7–11]. Стоит, однако, отметить, что механизмы вовлечения молекулярной подвижности в работу белка могут быть весьма замысловатыми и не столь легко объяснимыми. Пока не существует, да, наверное, и не может существовать в принципе единого рецепта или алгоритма связи тех или иных молекулярно-динамических параметров с той или иной биологической функцией. Это очень специфическая проблема, которая должна анализироваться в каждом конкретном случае по-своему.

Частотный диапазон колебаний атомов белка очень широк. Характерное время самых быстрых движений — единицы и доли фемтосекунды, самых медленных — секунды. Фемтосекундная область соответствует колебаниям валентных связей и валентных углов. Эта динамика изучается в основном методами оптической спектроскопии. Пикосекундная область и все, что медленнее, обуславливается конформационными степенями свободы структуры белка — двугранными (торсионными) углами ϕ и φ , обеспечивающими гибкость основной цепи белка, а также двугранными углами χ , определяющими конформацию боковых цепей аминокислотных остатков. Колебания этих углов могут быть очень быстрыми, если речь идет о движении отдельных химических групп. Например, характерное время вращения трех метильных протонов вокруг оси симметрии метильной группы при комнатной температуре составляет единицы пикосекунд. Низкоамплитудные некоррелированные колебания отдельных боковых цепей или небольших участков основной цепи могут составлять доли и единицы наносекунд. Крупномасштабные конформационные переходы всегда являются высококоррелированными изменениями многих степеней свободы белка, поскольку обычно белки — довольно плотно упакованные структуры, практически без свободного объема внутри глобулы. Сколько-нибудь заметные смещения одного домена структуры белка могут происходить только при согласованном смещении соседних доменов. Характерное время внутренней динамики этого типа находится в микро- и миллисекундном диапазоне. Следует отметить, что временной масштаб этой медленной динамики

совпадает с времененным масштабом многих молекулярно-биологических процессов, например таких, как связывание с субстратом, катализ, фолдинг и т.п. Поэтому вполне естественно предположить, что именно медленная конформационная динамика наиболее значима для биологической функции белка, и именно ее изучение представляет наибольший интерес с точки зрения биологии.

Комплекс методов, применяющихся до сих пор для изучения молекулярной динамики белков, включает в себя ЯМР, ЭПР, диэлектрическую, флуоресцентную, инфракрасную и мёссбауэровскую спектроскопии, нейтронное рассеяние, компьютерное моделирование и даже рентгеноструктурный анализ, который дает информацию о так называемых В-факторах, т.е. о степени "размазывания" координат атомов в пространстве из-за молекулярной подвижности. Однако к настоящему времени стало очевидным, что для изучения молекулярной динамики белков самым мощным и информативным методом, имеющим самый широкий спектр возможностей, является ЯМР. Для этого есть целый ряд причин, на которых мы сейчас останавливаться не будем.

При всем многообразии типов экспериментов и импульсных последовательностей, применяющихся к настоящему времени в ЯМР для получения информации о молекулярных движениях в различных системах, все они могут использовать только три природных ЯМР зонда, чувствительных к молекулярной динамике. Во-первых, это изотропный (т.е. усредненный по всем ориентациям) химический сдвиг магнитного ядра. Химический сдвиг зависит не только от химической структуры макромолекулы, но и от ее конформации. Если конформация биополимера подвижна и если эти движения приводят к заметному изменению химического сдвига, то это можно зарегистрировать с помощью соответствующих ЯМР экспериментов.

Как известно, химический сдвиг — величина в той или иной степени всегда анизотропная. То есть химический сдвиг зависит от ориентации электронной оболочки магнитного ядра по отношению к внешнему магнитному полю B_0 . Количественно эта анизотропия характеризуется 3×3 -тензором, который, как и изотропный химический сдвиг, зависит от электронной структуры молекулы. При реориентации тензора анизотропии химического сдвига (АХС), вызванного молекулярным движением, происходит изменение химического сдвига магнитного ядра. Тензор АХС — это второй ЯМР зонд, чувствительный к молекулярной динамике. К этому же типу зонда можно отнести и градиент электрического поля квадрупольных ядер. Эти параметры дают информацию о чисто вращательных движениях магнитных ядер.

Наконец, третий зонд — это диполь-дипольное взаимодействие магнитных ядер друг с другом, которое определяется расстоянием между ядрами и ориентацией межъядерного вектора по отношению к внешнему магнитному полю. Молекулярные движения модулируют как межъядерное расстояние (если ядра не связаны ковалентно друг с другом), так и ориентацию межъядерного вектора, что отражается на временах магнитной релаксации.

В зависимости от того, находится белок в растворе или в твердом состоянии, к нему применимы различные наборы экспериментов, позволяющих исследовать моле-

кулярную подвижность. По типу, точности и разнообразию получаемой информации жидкостные и твердотельные подходы различаются достаточно сильно. В одних случаях преимущество имеют эксперименты в растворах, в других — в твердом состоянии. Основной недостаток твердотельных ЯМР экспериментов — более низкое по сравнению с растворами спектральное разрешение, что затрудняет соотнесение линий спектра и получение селективной динамической информации. Что касается растворов, то в них изотропное броуновское вращение белка как целого накладывается на внутреннюю динамику, и все медленные внутренние движения, которые имеют время корреляции длиннее, чем время корреляции броуновского вращения, становятся практически невидимыми для физических методов, регистрирующих механическую реориентацию того или иного природного зонда. В число этих методов попадают ЯМР релаксация, диэлектрическая и флуоресцентная спектроскопии, ЭПР. Время корреляции броуновского вращения для большинства белков имеет величину порядка 10^{-8} с, соответственно все движения в микро- и миллисекундном диапазонах становятся почти недоступными для экспериментального изучения. Эти движения в растворах можно изучать только посредством таких непрямых методов, как, например, метод водородного обмена, или ЯМР методами, регистрирующими химический обмен, т.е. модуляцию изотропного химического сдвига конформационными переходами [11–13]. Основной недостаток этих подходов заключается в том, что величина химического сдвига, как и амплитуда его изменения, зависит от очень большого числа структурных и химических свойств исследуемой макромолекулы. До настоящего времени не создано надежных алгоритмов расчета химического сдвига по структурным данным, и уж тем более не решена обратная задача. Соответственно определяемое из эксперимента изменение химического сдвига в принципе не может дать никакой информации об амплитудных или геометрических характеристиках медленных молекулярных движений. Более того, непосредственно из эксперимента невозможно определить, подвержено движению само магнитное ядро, за которым наблюдает исследователь, или окружение этого ядра (например, бензольное кольцо ближайшей ароматической группы), что также может вызывать изменение химического сдвига. Хотя все эти недостатки подразумеваются сами собой, тем не менее в последние годы эти эксперименты применяются в белковых растворах для изучения медленных молекулярных движений относительно широко — просто за неимением лучшего.

Твердотельный ЯМР предоставляет гораздо больше возможностей для детального изучения параметров медленной (т.е. в микро- и миллисекундном диапазонах времен корреляции) конформационной динамики. До недавнего времени набор ЯМР экспериментов, пригодных для изучения молекулярной динамики в твердых биополимерах, ограничивался только двумя методами. Во-первых, это магнитная релаксация, включающая в себя релаксацию в лабораторной, вращающейся и дипольной системе координат, кросс-релаксацию между магнитными ядрами и измерения ширины линии (или, что то же самое, времени релаксации T_2) ЯМР спектра. Совокупность этих релаксационных методов дает информацию о молекулярных движениях в диапазоне времен корреляции от 10^{-10} до 10^{-3} с. Во-вторых, это анализ

формы линии ЯМР спектра статического или медленно вращающегося под магическим углом образца (под условием медленного вращения подразумевается, что скорость вращения меньше величины АХС, выраженной в частотных единицах). Этот метод регистрирует реориентацию тензора АХС, которая имеет время корреляции короче, чем характерное время спада свободной индукции (ССИ), или сравнимое с ним. Частотный диапазон этого метода зависит от величины АХС магнитного ядра, которая определяется как типом ядра, так и его электронной оболочкой. Но чаще всего анализ формы линии чувствителен к движениям с временами корреляции 10^{-4} с и короче. ЯМР релаксация и анализ формы линии — стандартные, давно и хорошо известные методы исследования молекулярной динамики, математический аппарат которых подробно описан в ряде классических монографий по магнитному резонансу [14–16].

Молекулярные движения, время корреляции которых длиннее ССИ, можно изучать только с помощью так называемой обменной спектроскопии, принципы которой будут подробно описаны ниже. Обменная спектроскопия давно и с успехом применяется в жидкостном ЯМР, а в твердом состоянии ее применение было ограничено рядом методических проблем, основной из которых была низкая чувствительность. Однако со второй половины 90-х годов XX века стали появляться методические разработки, значительно увеличивающие эффективность и расширяющие возможности обменной ЯМР спектроскопии твердого тела. Это привело к появлению новых оригинальных исследований динамического поведения различных молекулярных систем в твердом состоянии. Настоящий обзор посвящен изложению принципов различных типов обменных экспериментов и примеров их использования в исследованиях биополимеров.

2. Методика обменных экспериментов

Прежде всего оговоримся, что под термином "обмен" мы будем подразумевать переход магнитного ядра из состояния с одним химическим сдвигом в состояние с другим химическим сдвигом. Этот переход может быть вызван как изменением изотропного химического сдвига, т.е. локальной перестройкой химического микрорассеяния ядра, так и реориентацией тензора АХС. Если характерное время обмена длиннее, чем время ССИ, то этот процесс никак не отражается на форме ЯМР спектра, и обнаружить его можно только с помощью специальных импульсных последовательностей. Хотя существует множество модификаций обменных ЯМР экспериментов, во всех вариантах обменных импульсных последовательностей обязательно присутствуют три функционально значимых временных периода. Первый — это период эволюции, необходимый для регистрации частоты прецессии магнитного ядра, т.е. величины его химического сдвига, в первоначальный момент времени. Второй — время смешивания, в течение которого происходит сам акт обмена. Наконец, третий период — это регистрация ССИ, в течение которого определяется величина химического сдвига в конечный момент времени. Поскольку, как упоминалось выше, медленный обмен не проявляется в простом одномерном спектре, его можно увидеть в двумерном. Простей-

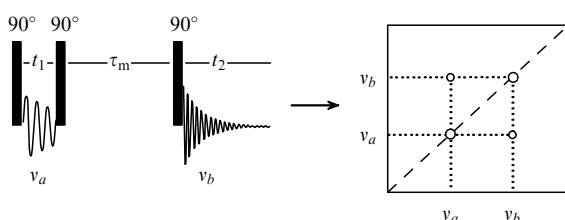


Рис. 1. Простейшая трехимпульсная последовательность двумерного обменного ЯМР эксперимента (слева) и двумерный ЯМР спектр (справа).

шая импульсная последовательность двумерного обменного эксперимента, впервые предложенная в работе [17], представлена на рис. 1.

Эта последовательность состоит из трех 90° -импульсов. Первый импульс кладет вектор намагниченности в плоскость $x-y$, после чего он прецессирует с круговой частотой ν_a . Второй импульс возвращает вектор намагниченности к направлению вдоль магнитного поля B_0 . По завершении времени смешивания τ_m третий импульс опять кладет намагниченность в плоскость $x-y$, после чего следует регистрация ССИ, т.е. частоты прецессии ν_b . В результате этого эксперимента мы имеем двумерный спад свободной индукции, который зависит от t_1 и t_2 .

Если время смешивания τ_m намного короче времени корреляции молекулярного движения τ_c , то обмена не произойдет, и ν_a будет равно ν_b . Двумерное фурье-преобразование по переменным t_1 и t_2 в этом случае даст двумерный спектр, в котором на диагонали будет находиться простой одномерный спектр, и не будет никаких недиагональных пиков. Если же $\tau_m \geq \tau_c$ и соответственно $\nu_a \neq \nu_b$, то в двумерном спектре появляются недиагональные пики (кросс-пики), расположенные симметрично относительно диагонали с координатами (ν_a, ν_b) и (ν_b, ν_a) . Измеряя зависимость амплитуды кросс-пиков от времени смешивания, можно получить информацию о времени корреляции молекулярного движения. В этом случае эксперимент становится, строго говоря, трехмерным. С его помощью можно регистрировать движения, имеющие времена корреляции короче или сравнимые со временем релаксации T_1 . Это связано с тем, что в период времени смешивания намагниченность ориентирована вдоль поля B_0 , а значит, она подвержена процессу спин-решеточной релаксации, который приводит к затуханию сигнала. Описанная выше последовательность (см. рис. 1) применима как для твердых тел, так и для растворов, с той лишь разницей, что в растворе под обменом мы должны подразумевать изменение только изотропного химического сдвига, потому что в растворе вся АХС усредняется быстрым изотропным броуновским вращением, а в твердом состоянии может происходить как изменение изотропного химического сдвига, так и реориентация тензора АХС.

Важно отметить, что в обменном двумерном спектре кросс-пики могут появляться не только вследствие молекулярного или химического обмена, но также из-за спинового обмена. В твердых телах он обусловлен спиновой диффузией, а в растворах — ядерным эффектом Оверхаузера. В последнем случае интенсивность этих кросс-пиков зависит от расстояния между магнитными ядрами, что дает возможность использовать обменную спектроскопию для определения простран-

ственной конформации различных молекул. До настоящего времени эксперимент NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) является основным инструментом определения структур белков в растворе.

Применение последовательности, изображенной на рис. 1, к изучению медленной молекулярной динамики в статических твердых изотропных образцах имеет существенное ограничение. Разброс ориентаций тензора АХС приводит к разбросу резонансных частот ν_a и ν_b и к появлению классического спектра порошкообразного образца вдоль диагонали двумерного спектра. А обмен в этом случае проявляется не в виде отдельных кросс-пиков, а в "расплывании" спектра в сторону от диагонали и в появлении замысловатых рельефов довольно сложной формы [18]. Хотя такой спектр может быть количественно проанализирован и из него в принципе может быть получена информация как о временах корреляции движения, так и об их амплитуде (в предположении, что обмен обуславливается реориентацией тензора АХС), на практике такие исследования весьма малоэффективны. Во-первых, уширение линий за счет разброса ориентаций тензора АХС приводит к низкой чувствительности сигнала. Во-вторых, это же уширение не дает возможности различить в спектре различные химически неэквивалентные (т.е. имеющие разный изотропный химический сдвиг) ядра, а значит, получать селективную информацию. Поэтому обменный эксперимент на твердых образцах в этой модификации практически не применяется.

Стандартным способом сужения линий в твердотельном ЯМР является механическое вращение образца под магическим углом, предложенное Рэймондом Эндрю почти полвека назад [19]. Вместе с подавлением диполь-дипольного межъядерного взаимодействия во время регистрации ССИ ("декаплингом") вращение под магическим углом (ВМУ) позволяет получать сравнимую с растворами ширину линии ЯМР спектра. С применением этих экспериментальных методик импульсная последовательность, изображенная на рис. 1, может регистрировать химический обмен (т.е. изменение изотропного химического сдвига) в твердых телах так же, как и в жидкостях [20]. Однако в большинстве случаев изменение изотропного химического сдвига в твердых телах очень мало по сравнению с изменением химического сдвига, вызванного реориентацией тензора АХС. Экспериментальное наблюдение последней представляет больший интерес, поскольку оно позволяет оценить амплитуду медленного молекулярного движения. Напомним, что в растворе это сделать невозможно в принципе.

При регистрации вращательного движения тензора АХС с помощью обменного эксперимента с ВМУ должно выполняться одно очевидное условие — время смешивания должно составлять целое число периодов вращения ротора. Это необходимо для того, чтобы образец непосредственно перед временем смешивания и сразу после него находился в одной и той же ориентации. В противном случае мы не сможем отличить реориентацию тензора АХС, вызванную молекулярным движением, от реориентации, вызванной механическим вращением образца. Практически это условие реализуется с помощью синхронизации первого и третьего 90° -импульсов с переменным сигналом от системы стабилизации вращения ротора. Импульсная последовательность такого эксперимента представлена на рис. 2. Кроме

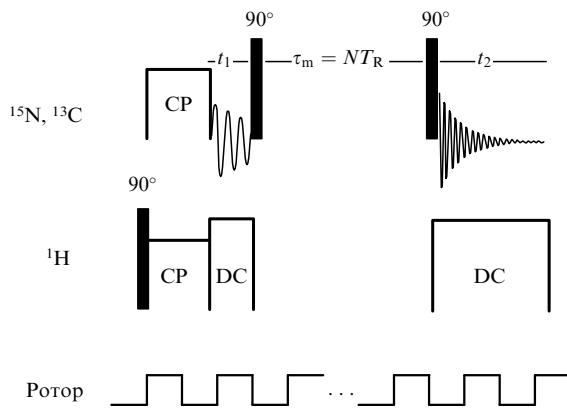


Рис. 2. Импульсная последовательность твердотельного обменного ЯМР эксперимента с ВМУ; CP — кросс-поляризация (cross-polarisation), DC — декаплинг (decoupling), T_R — период вращения ротора.

импульсов, воздействующих на наблюдаемые ядра, на рис. 2 также показаны импульсы, воздействующие на протоны. Это связано с тем, что до сих пор в белках обменные эксперименты проводились только на ядрах ^{13}C и ^{15}N , которые в твердотельном ЯМР обычно регистрируются с применением стандартных методик кросс-поляризации [21] и "декаплинга".

Для понимания, каким образом можно извлечь количественную информацию о молекулярной динамике из твердотельного обменного эксперимента с ВМУ, не обойтись без некоторых математических выражений. Недавно был опубликован обзор [22], в котором был очень подробно описан математический формализм всех известных на сегодняшний день твердотельных обменных экспериментов с использованием ВМУ. Ниже мы приведем основные формулы, дающие представление о принципах количественного анализа твердотельных обменных экспериментов и получения молекулярно-динамической информации.

Начнем со стандартного выражения, описывающего сигнал свободной индукции (ССИ) для отдельного магнитного ядра:

$$\text{fid}(t) = M_0 \exp(i\omega_0 t) \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right), \quad (1)$$

где M_0 — равновесная намагниченность, ω_0 — круговая резонансная частота, T_2 — время поперечной релаксации (fid — free induction decay, т.е. ССИ). Резонансная частота магнитного ядра определяется следующим образом:

$$\omega_0 = \gamma B_0 \sigma_{zz}, \quad (2)$$

где γ — гиromагнитное отношение магнитного ядра, B_0 — внешнее постоянное магнитное поле, а σ_{zz} — zz -элемент матрицы тензора АХС в предположении, что внешнее магнитное поле B_0 направлено вдоль оси z . В координатной системе главных осей тензора АХС, т.е. в системе, где недиагональные элементы равны нулю, этот тензор имеет вид

$$\boldsymbol{\sigma}^{\text{PAS}} = \begin{pmatrix} \sigma_{11} & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_{22} & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{33} \end{pmatrix}, \quad (3)$$

где элементы σ_{11} , σ_{22} и σ_{33} определяют химический сдвиг магнитного ядра, если направление B_0 совпадает соответственно с осями x , y и z этой системы координат (PAS — principal axes system). Для перехода из системы главных осей тензора АХС в лабораторную систему используется стандартное преобразование:

$$\boldsymbol{\sigma}^{\text{LF}} = \mathbf{R}(\alpha, \beta, \gamma) \boldsymbol{\sigma}^{\text{PAS}} \mathbf{R}^{-1}(\alpha, \beta, \gamma), \quad (4)$$

где $\mathbf{R}(\alpha, \beta, \gamma)$ — матрица перехода из одной системы координат в другую (LF — laboratory frame). α , β и γ — углы Эйлера, описывающие последовательные повороты системы координат при переходе в новую систему. Уравнение (4) является стандартной процедурой, поэтому мы здесь не приводим явный вид матрицы $\mathbf{R}(\alpha, \beta, \gamma)$ и точное определение углов Эйлера. Если мы имеем дело с изотропным образцом, т.е. он представляет собой аморфное тело, поликристалл или порошок, то в нем существует равномерное распределение тензоров АХС по всем возможным ориентациям, а значит, и распределение химических сдвигов. В этом случае необходимо проинтегрировать уравнение (1) по всем ориентациям тензора АХС, т.е. по всем углам Эйлера. В результате этой описанной во многих учебниках по ЯМР стандартной процедуры получается хорошо известная форма статического порошкообразного образца. По этой форме можно определить элементы тензора σ_{11} , σ_{22} и σ_{33} , а в случае наличия молекулярных движений в микросекундной области — оценить их параметры. Но если в образце есть несколько химически незквивалентных ядер и разброс их изотропных химических сдвигов сравним с величиной АХС, то твердотельный ЯМР спектр статического образца анализировать в большинстве случаев практически невозможно.

При использовании ВМУ уравнение (1) модифицируется; у резонансной частоты появляется циклическая зависимость от времени: $\omega_0(t) = \omega_0(t + T_R)$, где T_R — период вращения. И тогда спад свободной индукции можно записать таким образом:

$$\text{fid}(t) = M_0 \exp[i\Theta(0, t)] \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right), \quad (5)$$

где $\Theta(0, t)$ — фаза прецессирующей намагниченности к моменту времени t ,

$$\Theta(a, b) = \int_a^b \omega_0(t) dt. \quad (6)$$

Резонансная частота ω_0 определяется уравнением (2), в котором zz -элемент тензора АХС приобретает временную зависимость. Можно показать, что

$$\omega_0(t) = \omega_L \sigma_{\text{iso}} + \omega_L \sigma_{\text{aniso}}^{\text{LF}}(t) = \omega_{\text{iso}} + \omega_{\text{aniso}}(t), \quad (7)$$

где ω_L — ларморова частота магнитного ядра, σ_{iso} и σ_{aniso} обозначают изотропную и анизотропную составляющие химического сдвига:

$$\sigma_{\text{iso}} = \frac{1}{3} (\sigma_{11} + \sigma_{22} + \sigma_{33}), \quad (8)$$

$$\sigma_{\text{aniso}}(t) = C_2 \cos(2\omega_R t + 2\gamma) + S_2 \sin(2\omega_R t + 2\gamma) + C_1 \cos(\omega_R t + \gamma) + S_1 \sin(\omega_R t + \gamma); \quad (9)$$

здесь ω_R — круговая частота ВМУ, а коэффициенты $C_{1,2}$ и $S_{1,2}$ выражаются так:

$$C_2 = \frac{1}{3} \left\{ \frac{3}{2} (\sigma_{33} - \sigma_{\text{iso}}) \sin^2 \beta - \right. \\ \left. - \frac{1}{2} \left[\frac{1}{2} (\sigma_{22} - \sigma_{11}) \cos 2\alpha - \sigma_{12} \sin 2\alpha \right] (3 + \cos 2\beta) - \right. \\ \left. - (\sigma_{13} \cos \alpha + \sigma_{23} \sin \alpha) \sin 2\beta \right\}, \quad (10\text{a})$$

$$S_2 = \frac{2}{3} \left\{ \left[\frac{1}{2} (\sigma_{22} - \sigma_{11}) \sin 2\alpha + \sigma_{12} \cos 2\alpha \right] \cos \beta + \right. \\ \left. + (\sigma_{13} \sin \alpha - \sigma_{23} \cos \alpha) \sin \beta \right\}, \quad (10\text{b})$$

$$C_1 = \frac{\sqrt{2}}{3} \left\{ -\frac{3}{2} (\sigma_{33} - \sigma_{\text{iso}}) \sin 2\beta - \right. \\ \left. - \left[\frac{1}{2} (\sigma_{22} - \sigma_{11}) \cos 2\alpha - \sigma_{12} \sin 2\alpha \right] \sin 2\beta + \right. \\ \left. + 2(\sigma_{13} \cos \alpha + \sigma_{23} \sin \alpha) \cos 2\beta \right\}, \quad (10\text{c})$$

$$S_1 = \frac{2\sqrt{2}}{3} \left\{ \left[\frac{1}{2} (\sigma_{22} - \sigma_{11}) \sin 2\alpha + \sigma_{12} \cos 2\alpha \right] \sin \beta - \right. \\ \left. - (\sigma_{13} \sin \alpha - \sigma_{23} \cos \alpha) \cos \beta \right\}. \quad (10\text{d})$$

Эйлеровы углы α , β и γ в уравнениях (9) и (10) обозначают переход от системы координат ротора, ось Z которой ориентирована вдоль оси вращения ротора, в молекулярную систему координат. Элементы тензора АХС σ в уравнениях (10) соответствуют его представлению в этой молекулярной системе координат. Ориентация молекулярной системы координат в принципе может быть произвольной. Привязывать молекулярную систему координат к системе главных осей тензора АХС не совсем корректно, потому что в дальнейшем мы собираемся рассматривать движения тензора АХС как раз относительно молекулярной системы. Далее, проходя интегрирование в уравнении (6) с учетом уравнений (7)–(10), получим

$$\text{fid}(t) = \exp(i\omega_{\text{iso}}t) \exp[-i\Psi(\gamma)] \times \\ \times \exp[i\Psi(\gamma + \omega_R t)] \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right), \quad (11\text{a})$$

где

$$\Psi(x) = \frac{\omega_L}{\omega_R} \left(\frac{C_2}{2} \sin 2x - \frac{S_2}{2} \cos 2x + C_1 \sin x - S_1 \cos x \right). \quad (12)$$

Введя обозначение

$$f(x) = \exp[i\Psi(x)], \quad (13)$$

уравнение (11а) можно переписать в виде

$$\text{fid}(t) = \exp(i\omega_{\text{iso}}t) f^*(\gamma) f(\gamma + \omega_R t) \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right); \quad (11\text{b})$$

$f(x)$ — это так называемая f -функция, определяющая фазовую корреляцию поперечной намагниченности.

Переходя к изотропному образцу, т.е. проведя интегрирование по эйлеровым углам α , β и γ , можно получить следующее выражение для ССИ:

$$\text{fid}(t) = \exp(i\omega_{\text{iso}}t) \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right) \sum_{N=-\infty}^{\infty} \exp(iN\omega_R t) I_N, \quad (14)$$

где

$$I_N = \frac{1}{4\pi} \int_0^{2\pi} d\alpha \int_0^\pi \sin(\beta) F_N^* F_N d\beta, \quad (15)$$

$$F_N = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} \exp(-iNx) f(x) dx. \quad (16)$$

Выражение (14) дает наглядное представление о форме ЯМР спектра вращающегося под магическим углом образца: он представляет собой узкие одиночные пики, отделенные друг от друга частотным интервалом ω_R . В литературе эти пики часто обозначаются как ssb (spinning side bands). Центральный пик, соответствующий $N = 0$, находится на частоте изотропного химического сдвига. Интенсивности этих пиков пропорциональны I_N .

Теперь, используя введенные выше понятия и обозначения, перейдем к количественному описанию двумерного обменного эксперимента, импульсная последовательность которого изображена на рис. 2. Прежде всего определим, что молекулярное движение заключается в перескоках тензора АХС из одной ориентации относительно молекулярной системы координат в другую. Каждая ориентация определяется своими эйлеровыми углами, которые задают матрицу перехода из молекулярной системы координат в систему координат главных осей тензора АХС. Модель быстрых скачков между дискретными положениями (ориентациями) может быть применена и для аппроксимации диффузионного непрерывного вращения тензора АХС. Это можно сделать за счет простого увеличения числа возможных ориентаций тензора АХС. Вероятность перехода в единицу времени из одной ориентации в другую задается так называемой обменной матрицей \mathbf{K} . Недиагональный элемент этой матрицы K_{ji} ($j \neq i$) определяет вероятность перескока в единицу времени из ориентации i в ориентацию j , а диагональный элемент K_{jj} определяет вероятность перехода из состояния j во все остальные ориентации, которые имеют отрицательный знак. Таким образом, модель движения формально задается: 1) числом возможных ориентаций тензора АХС (далее обозначается как N_S); 2) набором эйлеровых углов для каждой из ориентаций; 3) обменной матрицей. Теперь посмотрим, как это будет отражаться в обменном эксперименте.

К моменту окончания периода эволюции (время t_1) поперечная намагниченность магнитных ядер, тензор АХС которых находится в ориентации j , выражается как

$$\text{fid}^j(t_1) = P_j^{\text{eq}} \exp[i\Theta^j(0, t_1)] \exp\left(-\frac{t_1}{T_2}\right), \quad (17)$$

где $\Theta^j(0, t_1)$ определяется уравнением (6), а P_j^{eq} — равновесная населенность ориентации j , которая в свою очередь определяется Больцмановским распределением. Допустим, что за период времени смешивания часть тензоров АХС за счет молекулярного движения перешла из ориентации j в ориентацию i . Для них поперечная намагниченность к окончанию периода t_2 будет выра-

жаться как

$$\begin{aligned} \text{fid}^{ij}(t_1, \tau_m, t_2) &= Q_{ij}(\tau_m) \exp [i\Theta^j(0, t_1)] \times \\ &\times \exp [i\Theta^i(t_1 + \tau_m, t_1 + \tau_m + t_2)] \exp \left(-\frac{t_1 + t_2}{T_2}\right), \quad (18) \end{aligned}$$

где

$$Q_{ij}(\tau_m) = P_{ij}(\tau_m) P_j^{\text{eq}} \exp \left(-\frac{\tau_m}{T_1}\right). \quad (19)$$

В уравнении (19) $P_{ij}(\tau_m)$ обозначает вероятность перехода тензора АХС из ориентации j в ориентацию i за время τ_m . Эти вероятности можно определить из дифференциального матричного уравнения

$$\frac{d\overline{P(t)}}{dt} = \mathbf{K}\overline{P(t)}, \quad (20)$$

где \mathbf{K} — обменная матрица. Решение уравнения (20) сводится к стандартному

$$\overline{P(t)} = \exp(\mathbf{K}t) \overline{P(0)}, \quad (21)$$

откуда видно, что вероятности $P_{ij}(\tau_m)$ определяются как

$$P_{ij}(\tau_m) = (\exp(\mathbf{K}\tau_m))_{ij}. \quad (22)$$

Явный вид экспоненциальной матрицы в уравнении (22) следующий:

$$\begin{aligned} \exp(\mathbf{K}\tau_m) &= \\ &= \mathbf{R}_D \begin{bmatrix} \exp(K_1\tau_m) & 0 & \dots & 0 \\ 0 & \exp(K_2\tau_m) & \dots & 0 \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ 0 & 0 & \dots & \exp(K_{N_s}\tau_m) \end{bmatrix} \mathbf{R}_D^{-1}, \quad (23) \end{aligned}$$

где K_1, K_2, \dots, K_{N_s} — собственные значения матрицы \mathbf{K} , \mathbf{R}_D — матрица преобразования, приводящая \mathbf{K} к диагональному виду.

Вспоминая определение f -функции, а также то, что время смещивания составляет целое число периодов ротора, уравнение (18) можно переписать в следующем виде:

$$\begin{aligned} \text{fid}^{ij}(t_1, \tau_m, t_2) &= Q_{ij}(\tau_m) \exp \left(-\frac{t_1 + t_2}{T_2}\right) \exp(i\omega_{\text{iso}}^j t_1) \times \\ &\times \exp(i\omega_{\text{iso}}^i t_2) f^{j*}(\gamma) f^j(\gamma + \omega_R t_1) f^{i*}(\gamma + \omega_R t_1) \times \\ &\times f^i(\gamma + \omega_R t_1 + \omega_R t_2). \quad (24) \end{aligned}$$

Индексы i и j около f -функций обозначают, что они соответствуют ориентациям i и j тензора АХС, и для них соответственно будут разными коэффициенты C_1, C_2, S_1 и S_2 (уравнения (10)), которые и определяют f -функцию. Интегрируя это выражение по эйлеровым углам α, β и γ , т.е. переходя к изотропному образцу, получаем

$$\begin{aligned} \text{fid}^{ij}(t_1, \tau_m, t_2) &= Q_{ij}(\tau_m) \exp \left(-\frac{t_1 + t_2}{T_2}\right) \exp(i\omega_{\text{iso}}^j t_1) \times \\ &\times \exp(i\omega_{\text{iso}}^i t_2) \sum_{M, N} \exp(iM\omega_R t_1) \exp(iN\omega_R t_2) I_{MN}^{ij}, \quad (25) \end{aligned}$$

где

$$I_{NM}^{ij} = \frac{1}{4\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^\pi F_M^j F_{M-N}^{ij} F_N^{i*} \sin \beta d\beta d\alpha; \quad (26)$$

здесь коэффициенты F_M^i определяются уравнением (16), а F_{M-N}^{ij} выглядят так:

$$F_{M-N}^{ij} = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} \exp[-i(M-N)x] f^j(x) f^{i*}(x) dx. \quad (27)$$

Из уравнения (25) видно, что амплитуда кросс-пика в двумерном спектре (без учета спин-решеточной релаксации), находящегося в точке с координатами $(\omega_{\text{iso}} + M\omega_R, \omega_{\text{iso}} + N\omega_R)$, и соответствующая ядрам, чьи тензоры АХС до времени смещивания были в ориентации j , а после — в ориентации i (или наоборот, это все равно), определяется величиной I_{MN}^{ij} . Вдоль диагонали (т.е. при условии $N = M$) располагаются пики, соответствующие одномерному спектру с ВМУ. А полная интенсивность пиков в двумерном спектре определяется суммированием по всем ориентациям до и после периода смещивания:

$$\text{INT}_{NM}(\tau_m) = \sum_{i,j}^{N_s} Q_{ij}(\tau_m) I_{NM}^{ij}. \quad (28)$$

Легко показать, что в самом простейшем случае обмена между двумя равновероятными ориентациями тензора АХС зависимость интенсивности кросс-пика от времени смещивания будет определяться следующим выражением:

$$\text{INT}_{NM}(\tau_m) = [1 - \exp(-2k\tau_m)] \frac{I_{NM}^{11} + I_{NM}^{12}}{2} \exp \left(-\frac{\tau_m}{T_1}\right), \quad (29)$$

где k — скорость обмена между ориентациями 1 и 2, которая входит в обменную матрицу.

Здесь будет уместно сделать четыре замечания о свойствах и природе обменного эксперимента с ВМУ. Первое, очевидно, что амплитуда кросс-пиков определяется геометрическими параметрами молекулярного движения. Причем в первом приближении можно сказать, что чем меньше угловая амплитуда реориентации тензора АХС, тем меньше и амплитуда кросс-пика. В предельном случае, когда обе ориентации совпадают, в уравнении (27) $f^j(x) = f^i(x)$, и тогда можно показать, что сумма в уравнении (25) становится пропорциональной дельта-функции с аргументом $M - N$, откуда следует, что в этом случае на спектре появятся только пики, для которых $M = N$, т.е. диагональные, а недиагональных пиков не будет. Эта зависимость амплитуды кросс-пиков от геометрии реориентации тензора АХС дает возможность получать информацию не только о частотных, но и об амплитудных параметрах молекулярной динамики.

Второе, из определения функции $\Psi(x)$ (12), которая в свою очередь определяет f -функцию (13), очевидно, что амплитуда кросс-пика зависит как от резонансной частоты ω_L , так и от частоты ВМУ ω_R . Значит, чтобы получить максимальную интенсивность кросс-пика по отношению к центральному диагональному пику, необходимо использовать максимально возможную резонансную частоту и вращать образец как можно медлен-

нее. Что касается выбора резонансной частоты, то он определяется только имеющимся в распоряжении исследователя набором ЯМР спектрометров и, увы, редко бывает слишком широким. А скорость ВМУ должна выбираться также и с учетом возможности хорошего спектрального разрешения и как можно большего отношения сигнала к шуму, так что выбор ω_R — это всегда результат компромисса.

Третье, двумерный обменный эксперимент позволяет отслеживать как реориентацию тензора АХС, о чем мы до сих пор в основном и вели речь, так и процессы химического обмена, т.е. изменение изотропного химического сдвига. Это видно из уравнения (25): кроме различных ориентаций тензора АХС появление кросс-пиков может обусловить и изменение изотропного химического сдвига. Именно поэтому в уравнении (25) ω_{iso}^i и ω_{iso}^j в общем случае могут быть и разными. Но, как мы отмечали выше, в биополимерах изменение изотропного химического сдвига, вызываемое конформационной динамикой, очень часто пренебрежимо мало по сравнению с изменением химического сдвига, вызываемым реориентацией тензора АХС.

Четвертое замечание касается спиновой диффузии. Как упоминалось выше, спиновая диффузия может быть причиной появления кросс-пиков и в отсутствие молекулярных движений. Строго говоря, сам по себе обменный эксперимент не может отличить реориентацию тензора АХС (или изменение изотропного химического сдвига) от диффузии намагниченности (так называемый флип-флоп-процесс) от одного магнитного ядра к другому. При очевидной разнице в физической природе этих процессов их проявление в обменном эксперименте и математическое описание, приведенное выше, абсолютно одинаковы. Единственное, на что могут уповать экспериментаторы, это измерение температурной зависимости времени обмена. Время корреляции молекулярной подвижности от температуры зависит, а скорость спиновой диффузии — практически нет, поскольку последняя определяется только системой межъядерных расстояний в образце. Эта разница может помочь разделить эти два эффекта.

При всех широких возможностях описанного выше двумерного обменного эксперимента с ВМУ он страдает существенным недостатком — во многих случаях он требует слишком долгого времени измерения. Запись двумерного спектра только при одном времени смешивания в самом лучшем случае занимает время порядка одного часа, но чаще всего это несколько часов и даже суток. Если стоит задача получения информации о времени корреляции медленного движения, то необходимо провести эксперименты при нескольких временах смешивания, и время проведения эксперимента соответственно увеличивается. Если еще исследовать и температурные зависимости, то время исследования одного образца чаще всего выходит за приемлемые пределы. Этим и объясняется тот факт, что широкого распространения метод двумерной обменной твердотельной спектроскопии не получил. По крайней мере нам не известно ни одного примера применения этого метода для исследования молекулярной динамики биологических полимеров.

Решением, хотя и частичным, этой проблемы стало уменьшение размерности обменного эксперимента — с двумерного до одномерного, что позволяет сократить

время эксперимента почти на порядок и при этом не потерять качество и количество динамической информации. Разработка одномерных модификаций обменного твердотельного ЯМР эксперимента с ВМУ началась примерно с середины 90-х годов XX века. Основная идея, лежащая в переходе от двумерного обменного эксперимента к его одномерным модификациям, заключается в фиксировании времени t_1 при определенном значении, связанном с частотой ВМУ, и применении специального циклирования фаз радиочастотных импульсов последовательности. Если в двумерном эксперименте процесс обмена можно обнаружить по наличию недиагональных пиков в двумерном спектре, то в одномерных модификациях обмен можно зарегистрировать только при измерении зависимости амплитуд (интенсивностей) линий спектра от времени смешивания. Если обмена нет, то спад амплитуды спектра определяется только спин-решеточной релаксацией. В противном случае амплитуда спадает быстрее. Величина и характерное время этого дополнительного спада как раз и определяются параметрами обмена.

К настоящему времени предложено несколько одномерных твердотельных ЯМР экспериментов с ВМУ:

- ODESSA (One Dimensional Exchange Spectroscopy by Ssb Alternation) [23];
- tr-ODESSA (time-reverse ODESSA) [24];
- Seldom ODESSA (SElectivity by Destruction Of Magnetization) [25];
- EIS (Exchange Induced Ssb) [26];
- PATROSS (Phase Adjusted ssb TR-OdeSSa) [27];
- CODEX (Centerband-Only Detection of EXchange) [28, 29].

Не вдаваясь в методические особенности каждого из этих экспериментов, отметим, что самым практичным и удобным из них является импульсная последовательность CODEX. Основной методической проблемой обменных экспериментов является выбор частоты ВМУ. Как указывалось выше, с одной стороны, она должна быть как можно меньше, чтобы эффект обмена проявился максимальным образом, а с другой — как можно больше, чтобы было хорошее разрешение спектра и максимальное отношение сигнала к шуму. В эксперименте CODEX это противоречие разрешено самым наилучшим образом, и потому после 2000 г. только этот тип одномерного обменного эксперимента используется для исследования медленной динамики как синтетических, так и биологических полимеров. Что касается последних, то, кроме последовательности CODEX для исследования динамики белков была также один раз применена последовательность tr-ODESSA [30]; эта работа будет рассмотрена ниже.

Импульсные последовательности экспериментов tr-ODESSA и CODEX представлены на рис. 3 и 4. В последовательности tr-ODESSA время t_1 всегда равно половине периода ВМУ, время смешивания всегда составляет нечетное число полупериодов ВМУ, а регистрация сигнала свободной индукции начинается через половину периода ВМУ после последнего 90°-импульса. Важную роль в этом эксперименте играет фазовый цикл импульсов и частоты детектирования сигнала свободной индукции, который подробно описан в [24]. Этот фазовый цикл обеспечивает то, что при любом времени смешивания как в отсутствие, так и при наличии обмена центральные и ssb-пики всех химически неэквивалентных

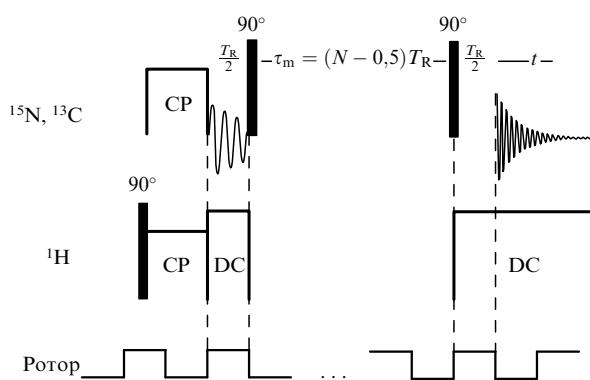


Рис. 3. Импульсная последовательность одномерного твердотельного обменного ЯМР эксперимента tr-ODESSA [24].

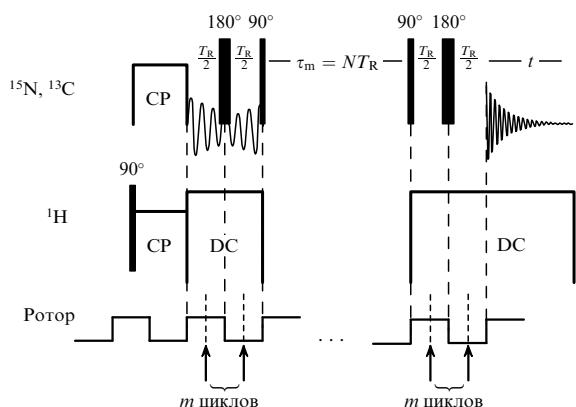


Рис. 4. Импульсная последовательность одномерного твердотельного обменного ЯМР эксперимента CODEX [28, 29].

магнитных ядер имеют положительные амплитуды. В предшествующей версии этого эксперимента [23] амплитуды центрального и ssb-пиков изменяются по закону $(-1)^N$, где N — номер ssb-пика ($N = 0$ соответствует центральному пику). При наличии нескольких химически неэквивалентных ядер в молекуле это может существенно усложнить вид ЯМР спектра и анализ молекулярной динамики.

В конечном счете интенсивность центрального и ssb-пиков определяется как

$$I_N^{\text{tr-ODESSA}} = \sum_{i,j}^{N_S} \sum_M Q_{ij}(\tau_m) (-1)^{M-N} I_{NM}^{ij}, \quad (30)$$

где обозначения $Q_{ij}(\tau_m)$, M , N и I_{NM}^{ij} играют ту же самую роль, что и в рассмотренном выше двумерном обменном эксперименте. Таким образом, в эксперименте tr-ODESSA пик в одномерном спектре является суммой пика простого одномерного спектра и всех кросс-пиков спектра двумерного обменного эксперимента, расположенных вдоль одной вертикали (или, что то же самое, горизонтали) с чередующимися знаками.

Главная особенность импульсной последовательности CODEX (см. рис. 4) состоит в том, что до и после времени смешивания на спины воздействует цикл из m 180°-импульсов (m — строго нечетное число), разделенных между собой полупериодом ВМУ. Таким образом, период эволюции может составлять несколько периодов ВМУ. Физический смысл этих импульсов состоит в том,

что они реинвертируют АХС каждые полпериода ВМУ и таким образом не позволяют усреднить АХС даже при очень быстром ВМУ. Их действие в некотором смысле аналогично действию 180°-импульсов в хорошо известной последовательности Карра–Парселла, где они компенсируют эффект неоднородности магнитного поля. В данном же случае 180°-импульсы компенсируют эффект ВМУ за счет того, что каждые полпериода ВМУ меняется знак фазы прецессирующей намагниченности. В результате АХС в периоды до и после времени смешивания не усредняется, что позволяет получать информацию о реориентации тензора АХС, и в то же время благодаря быстрому ВМУ спектр ЯМР имеет более интенсивные центральные пики, что улучшает отношение сигнала к шуму и спектральное разрешение.

Интенсивность линий спектра в эксперименте CODEX выражается чуть более сложным образом:

$$I_N^{\text{CODEX}} = \sum_{i,j}^{N_S} Q_{ij}(\tau_m) I_N^{ij, \text{CODEX}}, \quad (31)$$

где

$$I_N^{ij, \text{CODEX}} = \frac{1}{4\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^\pi C_N^{ij}(\alpha, \beta) \sin \beta d\beta d\alpha, \quad (32)$$

$$\begin{aligned} C_N^{ij}(\alpha, \beta) = & \sum_M \exp [i(M-N)\pi] \times \\ & \times \left[\frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} \exp (iM\gamma) f^{i*}(\gamma) (f^{j*}(\gamma) f^i(\gamma))^{m+1} d\gamma \right] \times \\ & \times \left[\frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} \exp [-i(M-N)\vartheta] (f^j(\vartheta) f^{i*}(\vartheta))^{m+1} d\vartheta \right] \times \\ & \times \left[\frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} \exp (-iN\phi) f^i(\phi) d\phi \right]. \end{aligned} \quad (33)$$

Из этих формул видно, что чем больше m , тем чувствительнее эксперимент к обмену (т.е. тем сильнее зависимость амплитуды пиков от времени смешивания). В эксперименте tr-ODESSA подобное увеличение может быть достигнуто только уменьшением частоты ВМУ, что, как упоминалось выше, приводит к спаду отношения сигнала к шуму и ухудшению спектрального разрешения. В то же время увеличение частоты ВМУ и числа m в эксперименте CODEX также имеет естественные пределы: при высоких скоростях ВМУ длительность 180°-импульса становится сравнимой с периодом вращения, что крайне усложняет количественный анализ данных. Кроме того, следует иметь в виду, что удлинение периода эволюции, т.е. увеличение произведения mT_R , может привести к значительному ухудшению отношения сигнала к шуму, если mT_R сравнимо с T_2 . Еще одна особенность этого эксперимента состоит в том, что он, в отличие от tr-ODESSA, нечувствителен к химическому обмену, т.е. к изменению изотропного химического сдвига, а отражает только реориентацию тензора АХС. Это происходит благодаря наличию 180°-импульсов, которые нивелируют разность скоростей прецессии намагниченности до и после времени смешивания, возникающую вследствие разности изотропных химических сдвигов. Это хорошо известное свойство последовательности Карра–Парселла.

Приведенный выше математический формализм обменных экспериментов с ВМУ может быть сведен к

одному схематическому выражению:

Амплитуда линии =

$$= \text{Функция} \left(\begin{array}{ll} \text{Экспериментальные} & \text{Молекулярные} \\ \text{параметры:} & \text{параметры:} \\ \omega_L — \text{резонансная} & \sigma — \text{тензор АХС} \\ \text{частота} & N_S — \text{число возможных} \\ \omega_R — \text{частота ВМУ} & \text{ориентаций тензора} \\ t_1 — \text{период эволюции} & \text{АХС} \\ \tau_m — \text{время смешивания} & \alpha_i, \beta_i, \gamma_i, i = 1, N_S, — \\ & \text{Эйлеровы углы} \\ & \text{для всех ориентаций} \\ & \mathbf{K} — \text{обменная матрица} \end{array} \right). \quad (34)$$

Смысл обменных экспериментов состоит в том, чтобы, измеряя амплитуду линий в ЯМР спектре при различных экспериментальных параметрах, прежде всего при различных временах смешивания, с помощью уравнения (34) определить параметры, характеризующие молекулярную динамику. При этом конкретный вид Функции в уравнении (34), конечно же, зависит от типа обменного эксперимента. Временной диапазон молекулярных движений, к которому чувствительны обменные эксперименты, определяется, с одной стороны, минимальным временем смешивания, а с другой — временем релаксации T_1 . Поскольку минимальное время смешивания определяется периодом ВМУ, то оно может составлять доли миллисекунды (типичные значения частоты ВМУ — несколько килогерц). Что касается времени T_1 , то оно зависит от многих как экспериментальных, так и молекулярных параметров, и может меняться от десятков-сотен миллисекунд до десятков-сотен секунд.

В заключение методической части обзора — несколько замечаний относительно магнитных ядер, на которых можно проводить обменные ЯМР эксперименты. За единичными исключениями до сих пор все ЯМР эксперименты в белках проводились только на четырех типах ядер: ^1H , ^2H , ^{13}C и ^{15}N . Протоны и углероды-13 можно использовать при их естественном содержании, а эксперименты на дейtronах и азотах-15 всегда подразумевают тотальное или селективное изотопное обогащение образца. Твердотельные обменные эксперименты удобнее проводить на тех ядрах, которые имеют наибольшую АХС — это приводит к большей амплитуде обменного спада в зависимости интенсивности линий спектра от времени смешивания. По этой причине протоны совершенно непригодны для обменных экспериментов, поскольку АХС протонов в органических соединениях очень мала и, кроме того, время T_2 протонов настолько короткое, что ССИ за время эволюции пропадает практически полностью. Остальные три типа магнитных ядер вполне пригодны для обменных экспериментов, хотя и в разной степени. Дейтроны обладают наибольшей степенью АХС (точнее говоря, анизотропии квадрупольного расщепления), но у них также и самое короткое T_1 , что сужает временной диапазон чувствительности обменного эксперимента. Кроме того, дейтроны имеют очень узкий разброс изотропных химических сдвигов, что делает невозможным разрешение и соотнесение линий сложного спектра. Поэтому очень часто в белках дейtronами метится только одна химическая позиция. При этом решается проблема соотнесения линий спектра, но ухудшается репрезентативность получаемой из ЯМР эксперимента информации. До настоящего времени дейтроны не применялись в твердотельных

обменных ЯМР исследованиях динамики белков, хотя они очень широко используются в работах по анализу формы линии спектра статического образца [31]. Из ядер ^{13}C и ^{15}N наибольшей степенью АХС обладают те из них, которые находятся на основной цепи. Это, прежде всего, карбонильные углероды, ковалентно связанные с ними азоты и, в меньшей степени, альфа-углероды. Алифатические углероды и азоты, локализованные на боковых цепях, обладают гораздо меньшей степенью АХС, хотя при условии хорошей чувствительности сигнала, высокой резонансной частоты и большого числа накоплений обменный эксперимент может быть проведен в принципе и на этих ядрах. Конечно же, в каждом конкретном случае могут быть свои специфические факторы, обуславливающие удобство и привлекательность или, наоборот, бесполезность использования тех или иных магнитных ядер для тех или иных целей. В то же время общей закономерностью является то, что одновременное использование разных магнитных ядер в одном и том же образце может многократно увеличить количество и точность молекулярно-динамической информации. Увы, технически это выполнимо далеко не всегда.

3. Применение обменных твердотельных экспериментов для исследования динамики белков

Первая работа по изучению динамики белков твердотельными обменными ЯМР методами появилась в 1999 г. [30]. В ней изучалась динамика основной цепи белка барстар и синтетического полипептида — полиглицина. В барстаре эксперименты проводились на ядрах ^{15}N , для чего белок был totally обогащен изотопом ^{15}N , а в полиглицине — на ядрах ^{13}C естественного содержания. Использовалась импульсная последовательность tr-ODESSA [24]. Как и во многих других работах по изучению динамики белков в твердом состоянии, барстар и полиглицин исследовались в сухом и увлажненном виде. Интерес к проведению экспериментов при различных уровнях гидратации обусловлен тем, что взаимодействие белка с водой обуславливает многие его функциональные свойства, в том числе и внутреннюю динамику (см. обзоры [32, 33]). Проводя эксперименты при различных степенях увлажнения, можно определить характер и природу влияния гидратной воды на те или иные свойства белка. Тотальное обогащение ядрами ^{15}N давало в одномерном твердотельном спектре одну широкую линию, относящуюся к азотам основной цепи, и потому позволяло получать только интегральную информацию о динамическом поведении всей основной цепи в среднем. Что касается полиглицина, то на спектре было две линии, относящиеся к карбонильным и альфа-углеродам. В данной работе анализировалась амплитуда линии карбонилов, поскольку они обладают гораздо большей степенью АХС. С целью учета спин-решеточной релаксации были проведены отдельные измерения времени релаксации T_1 стандартным методом [34]. Затем вычислялось отношение амплитуды линии в обменном эксперименте к амплитуде этой же линии в релаксационном эксперименте при одинаковых времени смешивания и релаксационной задержке в этих двух экспериментах соответственно. Это стандартная процедура коррекции обменного спада, исключающая влияние спин-решеточной релаксации.

Как в барстаре, так и в полиглицине наблюдался обменный спад достаточно высокой амплитуды с характерным временем порядка нескольких сотен миллисекунд. Однако, как показали температурные зависимости, в основном этот спад обусловлен не молекулярными движениями, а спиновой диффузией между магнитными ядрами. Это следует из анализа температурных зависимостей обменных спадов, которые в этой работе были проведены в диапазоне от -50°C до $+100^{\circ}\text{C}$. Лишь только в увлажненном до степени 0,2 г воды на 1 г белка барстаре при температурах выше 0°C наблюдалась зависимость формы начального участка обменного спада (первые 300–400 мс) от температуры, в то время как во всех остальных случаях как в барстаре, так и в сухом и увлажненном полиглицине форма обменного спада от температуры никак не зависела. Отсюда следует, что молекулярные движения основной цепи проявляются только в увлажненном барстаре, а сухой барстар и полиглицин — слишком жесткие структуры для существования в них таких медленных и крупномасштабных конформационных движений.

Для того чтобы объяснить, почему молекулярные движения не проявляются в увлажненном барстаре при низких температурах, была количественно рассмотрена модель обмена, изображенная на рис. 5. Она предполагает, что два магнитных ядра участвуют в скачках между двумя равновероятными ориентациями: для одного ядра между ориентациями 1 и 2, а для другого ядра — между ориентациями 3 и 4. Для простоты полагается, что параметры молекулярного движения для двух ядер одинаковы. В то же время между двумя ядрами происходит процесс спинового обмена. Сеть обменных процессов между четырьмя положениями обозначена на рис. 5 стрелками. Скорость молекулярной реориентации обозначена как k_{MR} , а спинового обмена — k_{SE} . Обменная матрица для такой системы выглядит следующим образом:

$\mathbf{K} =$

$$= \begin{pmatrix} -2k_{\text{SE}} - k_{\text{MR}} & k_{\text{MR}} & k_{\text{SE}} & k_{\text{SE}} \\ k_{\text{MR}} & -2k_{\text{SE}} - k_{\text{MR}} & k_{\text{SE}} & k_{\text{SE}} \\ k_{\text{SE}} & k_{\text{SE}} & -2k_{\text{SE}} - k_{\text{MR}} & k_{\text{MR}} \\ k_{\text{SE}} & k_{\text{SE}} & k_{\text{MR}} & -2k_{\text{SE}} - k_{\text{MR}} \end{pmatrix}. \quad (35)$$

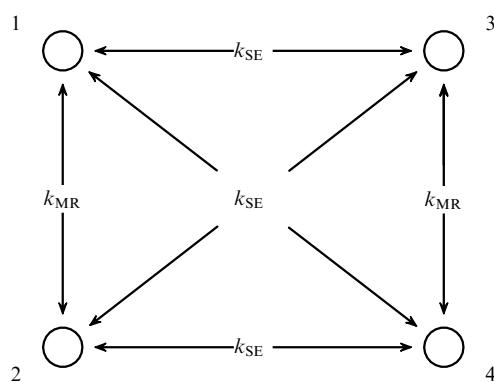


Рис. 5. Схема спинового обмена между двумя магнитными ядрами, которые в свою очередь участвуют в молекулярном движении — скачках между двумя равновероятными положениями.

Проведя с этой матрицей вычисления, описанные выше, и допуская, что $I_N^{13} = I_N^{14} = I_N^{23} = I_N^{24}$ и $I_N^{12} = I_N^{34}$, где I_N^{ij} — интенсивность ssb-пика с номером N в эксперименте tr-ODESSA (30) при нулевом времени смешивания, получим следующую зависимость интенсивности линии от времени смешивания:

$$\frac{I_N(\tau_m)}{I_N(0)} = \left[1 - P_1 \left(1 - \exp \left(-\frac{\tau_m}{\tau_1} \right) \right) - P_2 \left(1 - \exp \left(-\frac{\tau_m}{\tau_2} \right) \right) \right] \exp \left(-\frac{\tau_m}{T_1} \right), \quad (36)$$

где

$$I_N(0) = I_N^{11}, \quad P_1 = \frac{I_N^{11} - I_N^{12}}{2I_N^{11}}, \quad P_2 = \frac{I_N^{11} + I_N^{12} - 2I_N^{13}}{4I_N^{11}},$$

$$\tau_1 = \frac{1}{2(k_{\text{MR}} + k_{\text{SE}})}, \quad \tau_2 = \frac{1}{4k_{\text{SE}}}.$$

Таким образом, обменный спад состоит из двух компонент; характерное время одной из них определяется только скоростью спиновой диффузии, а другой — суммой скоростей спиновой диффузии и молекулярной реориентации. Из уравнения (36) видно, что молекулярное движение может быть зарегистрировано, только если оно быстрее, чем скорость спиновой диффузии, т.е. если $k_{\text{MR}} \geq k_{\text{SE}}$. В противном случае молекулярное движение в принципе не может быть обнаружено с помощью обменного эксперимента.

Что касается медленного молекулярного движения в увлажненном барстаре, то анализ обменных спадов при температурах 25°C и выше показал, что его время корреляции при комнатной температуре составляет десятки-сотни миллисекунд, а энергия активации — 40–120 кДж моль $^{-1}$. Однако этот анализ мог дать только грубые количественные оценки, поскольку разделение обменного спада на компоненты спиновой диффузии и молекулярного движения в этой работе проводилось буквально "на глаз".

Отдельного обсуждения заслуживает природа обменного спада, которая наблюдалась на карбонильных углеродах в полиглицине. Поскольку форма этого спада не проявляла температурной зависимости, этот обмен был также отнесен к спиновой диффузии между ядрами ^{13}C . Однако сейчас мы можем утверждать, что это не совсем так. Естественное содержание ядер ^{13}C — немногим более одного процента, и среднее расстояние между этими ядрами в полипептиде достаточно большое. Скорость спиновой диффузии имеет очень сильную зависимость от расстояния между ядрами, и потому в этом случае она может проявляться только при временах смешивания порядка долей и единиц секунд. Что же касается более коротких времен, то там обменный спад объясняется наличием дипольного взаимодействия углеродов с ковалентно связанными ядрами ^{14}N , находящимися в пептидной связи. Это взаимодействие может модулировать резонансную частоту так же, как и реориентация тензора АХС. А характерное время этой модуляции определяется скоростью перескока спина ядер ^{14}N с одного зеемановского уровня на другой, т.е. скоростью спин-решеточной релаксации. Поскольку ядра ^{14}N квадрупольные, их время релаксации T_1 достаточно короткое, оно имеет величину порядка единиц и десятков миллисекунд. Это так называемый RIDER-

эффект (Relaxation-Induced Dipolar Exchange with Recoupling) [35, 36]. Следовательно, динамика полипептидной цепи может исследоваться с помощью обменных экспериментов на карбонильных и альфа-углеродах только в ^{15}N -обогащенных образцах (эти ядра имеют очень длинное T_1). В противном случае взаимодействие $^{13}\text{C}-^{14}\text{N}$ должно быть каким-либо образом подавлено.

Таким образом, работа [30] показала, что твердотельные обменные ЯМР эксперименты могут служить эффективным средством для изучения динамики белков в миллисекундной области, но в то же время она продемонстрировала, что спиновая диффузия может существенно затруднять количественный анализ данных. Вообще говоря, спиновая диффузия является очень полезным свойством ядерного магнетизма, когда речь идет о соотнесении линий в спектре ЯМР и об определении пространственной структуры белка [37–40]. Но в исследованиях молекулярной динамики это почти всегда — помеха. В обменных экспериментах она дает дополнительную компоненту в спаде, а в релаксационных усредняет времена релаксации между различными ядрами, что не позволяет получать селективную динамическую информацию. Самый простой способ подавления спиновой диффузии между такими ядрами, как ^{15}N и ^{13}C — это протонный "декаплинг", т.е. подавление диполь-дипольного взаимодействия этих ядер с протонами. Поскольку спиновая диффузия между азотами (углеродами) зависит от величины $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ ($^{13}\text{C}-^1\text{H}$) дипольного взаимодействия [16], то декаплинг может существенно замедлить ее скорость. Однако реализовать этот способ в большинстве твердотельных обменных и релаксационных экспериментов практически невозможно, поскольку декаплинг в течение долей и единиц секунд может вывести из строя усилитель спектрометра и привести к перегреву образца. Кроме того, было показано, что в некоторых случаях декаплинг может привести даже к ускорению спиновой диффузии [41]. Единственным практически выполнимым решением этой проблемы на сегодняшний день является применение селективного ^{15}N - или ^{13}C -изотопного обогащения белков. Кроме замедления спиновой диффузии селективное мечение также существенно улучшает разрешение спектра и облегчает соотнесение линий, хотя в то же время и ухудшает презентативность динамической информации.

Как упоминалось выше, все последующие твердотельные обменные ЯМР исследования динамики биополимеров проводились с использованием импульсной последовательности CODEX [28, 29]. Первый опыт применения этой последовательности для изучения медленной динамики белков был описан в работе [42]. Эксперименты проводились на двух белках, имеющих очень разную структуру — убиквитин человека и белок гидрогель-АСА. Убиквитин — очень компактный и жесткий белок, почти 90 % цепи которого образуют вторичную структуру, а трехдоменный белок АСА состоит из центральной неупорядоченной части и двух жестких доменов по краям, которые могут двигаться практически независимо друг от друга. Как и во многих других работах группы М. Хонг (M. Hong) из Университета Айовы (США), здесь применялась технология так называемого "селективного и интенсивного" мечения белков изотопом ^{13}C [43, 44]. По сути это полуселективное обогащение, при котором метятся только десять из

двадцати аминокислот. Это позволяет "прорежать" спектр ЯМР и вместе с широким разбросом химических сдвигов углеродов в некоторых случаях получать соотнесение пиков спектра определенным типам углеродов определенных аминокислот. Такой способ не дает сайт-специфического соотнесения линий, т.е. соотнесения линий определенным атомам в глобуле белка, но зато позволяет получить более презентативную информацию по сравнению с селективным изотопным мечением. Как убиквитин, так и АСА были totally обогащены изотопом ^{15}N и полуселективно (согласно упомянутой выше методике) — изотопом ^{13}C . В этой работе проводился обменный эксперимент на ядрах ^{15}N , но детектирование сигнала проводилось по сигналу углеродов: перед записью ССИ намагниченность от азотов передавалась ковалентно связанным альфа-углеродам основной цепи. Цель такой сложной методики — получить частичное разрешение и соотнесение спектра, поскольку спектр ^{15}N totally обогащенного образца этого сделать не позволяет: разброс изотропных химических сдвигов азотов уже, чем у углеродов, и потому спектр азотов-15, находящихся в основной цепи белка, представляет собой одну широкую линию. В результате было обнаружено, что убиквитин не проявляет никакой динамики в миллисекундной области, а в белке АСА, наоборот, в эксперименте CODEX хорошо наблюдается спад зависимости интенсивности линий спектра от времени смешивания со временем корреляции 80 мс. Такая разница была объяснена различной природой этих двух белков.

В то же время возникает вопрос: почему на убиквитине не наблюдалась спиновая диффузия между ядрами ^{15}N , которая очень хорошо наблюдалась ранее на барстаре [30]? Самое вероятное объяснение этого противоречия состоит в том, что в этих экспериментах применялась разная скорость ВМУ — 7 и 2 кГц соответственно. Дело в том, что если скорость ВМУ значительно превышает величину межъядерного дипольного взаимодействия, выраженную в частотных единицах, то ВМУ приводит к усреднению этого взаимодействия. Взаимодействия $^{1}\text{H}-^1\text{H}$ и $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ составляют величину порядка 20 кГц, и потому для усреднения этих взаимодействий скорость ВМУ должна быть, как минимум, 40–50 кГц. Хотя уже есть примеры достижения такой скорости ВМУ [45], эти эксперименты связаны с очень серьезными техническими трудностями и пока широкого распространения не получили. Иное дело — взаимодействие $^{15}\text{N}-^1\text{H}$, которое составляет всего примерно 3 кГц. ВМУ при 7 кГц вполне может привести к его значительному усреднению. Как упоминалось выше, скорость спиновой диффузии между азотами во многом определяется дипольным взаимодействием азотов с ковалентно связанными протонами. Таким образом, высокая скорость ВМУ может служить причиной того, что в убиквитине спиновая диффузия между азотами не наблюдалась. Можно предположить, что высокая скорость ВМУ может подавить и упоминавшийся выше RIDER-эффект, хотя необходимо отметить, что детальных исследований влияния скорости ВМУ на величину взаимодействий $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ и $^{14}\text{N}-^{13}\text{C}$ до сих пор опубликовано не было.

В дальнейшем при изучении динамики биополимеров обменная твердотельная ЯМР спектроскопия применялась в комплексе с другими ЯМР методами, дающими

информацию о молекулярной подвижности. Динамика упоминавшегося выше белка АСА была подробно изучена в работе [46]. Сравнение углеродных спектров, которые были получены с помощью кросс-поляризации от протонов, и прямого возбуждения углеродов простым 90°-импульсом показало, что центральная полиэлектролитная часть белка имеет практически изотропную подвижность на микросекундной временной шкале, в то время как жесткие спиральные боковые домены неподвижны. Такое сравнение двух типов спектров позволяет качественно оценить величину ^{1}H – ^{13}C дипольного взаимодействия, поскольку именно этим взаимодействием обусловлен эффект кросс-поляризации. Если в образце присутствует молекулярное движение со временем корреляции меньшим, чем обратная величина взаимодействия ^{1}H – ^{13}C , выраженного в частотных единицах, то оно приводит к частичному или полному его усреднению. В этом случае кросс-поляризация неэффективна. В то же время эффективность прямого возбуждения углеродов от их взаимодействия с протонами не зависит.

Наибольший интерес в этой работе представляет анализ данных по обменной спектроскопии. Как уже было показано [42], эксперимент CODEX на ядрах ^{15}N в этом белке регистрирует медленные движения со временем корреляции 80 мс при комнатной температуре. Поскольку возбуждение азотов осуществлялось методом кросс-релаксации от протонов, это медленное движение соотносилось с движением жестких концевых доменов белка АСА. Как времена корреляции, так и амплитуды обменного спада для различных линий в спектре были очень близки. Отсюда был сделан вывод о том, что это движение является реориентацией доменов как целого. Для того чтобы определить амплитудно-геометрические параметры этого движения, была количественно проанализирована зависимость амплитуды обменного спада (измеряемой при времени смешивания, значительно большем, чем время корреляции) от времени эволюции t_1 , которое в эксперименте CODEX определяется произведением mT_R (см. рис. 4). Зависимость амплитуды обменного спада от времени эволюции позволяет получать гораздо более определенную информацию о геометрических параметрах молекулярного движения по сравнению с анализом спада только при одном времени эволюции. Это существенное преимущество обменного эксперимента по сравнению с ЯМР релаксацией и анализом формы линии спектра.

Были теоретически рассчитаны зависимости при различных амплитудах для трех различных моделей — вращение концевых доменов вокруг своей длинной оси, их изотропная диффузионная реориентация и скачки между двумя положениями. Сравнение экспериментальных и теоретических кривых показало, что только первая и третья модели могут адекватно объяснить эксперимент, в то время как модель диффузионной реориентации доменов экспериментальной зависимости явно не соответствует. Хотя имеющихся данных было недостаточно для однозначного выбора только одной модели движения, наиболее близкой к реальности, тем не менее расчеты показали, что вне зависимости от модели угловая амплитуда движения жестких концевых доменов составляет около 50°.

Изучение медленной динамики белка АСА представляет интерес, потому что оно может дать важную информацию о свойствах и структуре гидрогелей.

3*

Функциональная роль жестких концевых доменов — обеспечение межмолекулярной агрегации, препятствующей выпадению белка в осадок, в то время как центральная полиэлектролитная часть выступает в качестве агента набухания. Наблюдаемая в этой работе медленная реориентация концевых доменов, по всей видимости, отражает динамическую структуру гидрогеля, т.е. характерное время и возможные механизмы переходов концевых доменов из одного агрегата в другой. Естественно предположить, что характеристики этого равновесного динамического процесса обуславливают и многие макроскопические физико-химические свойства гидрогелей.

Этой же исследовательской группой было проведено детальное изучение молекулярной динамики мембранных белка колицина в свободном и связанном с мембраной состояниях [47]. Этот белок также был totally помечен ^{15}N и полуселективно — ^{13}C . В спектре ^{13}C можно было различить альфа-углероды восьми типов аминокислот и углероды боковых цепей двух типов аминокислот. Для исследования молекулярных движений применялся широкий комплекс ЯМР методов, позволяющий получить информацию о молекулярной динамике в различных частотных диапазонах. Измерялись константы ^{13}C – ^{1}H и ^{1}H – ^{1}H диполь-дипольного взаимодействия с помощью экспериментов DIPSHIFT [48] и WISE [49] соответственно. Эти константы давали информацию об общей амплитуде всех движений со временами корреляции короче 10^{-5} с. Анализ формы спектра ядер ^{15}N статического образца давал информацию об амплитуде движений основной цепи с временами корреляции короче 10^{-4} с. Кроме того, измерялись времена протонной релаксации во вращающейся под магическим углом системе координат (последовательность Ли–Гольдбурга [50]), которые давали информацию о динамике в микросекундной области. Детектирование сигнала в этом эксперименте проводилось на ядрах ^{13}C , что позволяло за счет широкого разброса химических сдвигов углеродов получить селективность протонных релаксационных измерений. И, наконец, динамика основной цепи в миллисекундной области исследовалась с помощью эксперимента CODEX на ядрах ^{15}N с детектированием на углеродах (см. описание этой методики выше) при нескольких временах смешивания от 1 до 400 мс.

В результате этого комплексного исследования было установлено, что в колицине существуют молекулярные движения в микро- и наносекундной областях времен корреляций и что связывание белка с мембраной приводит к существенному росту амплитуды как основной, так и боковых цепей. Как предполагают авторы, увеличенная подвижность белка в мембране является необходимым условием его нормальной работы — обеспечения работы канала в мембране. В то же время интересно отметить, что в миллисекундной области никакой динамики в колицине методом обменной спектроскопии зафиксировать не удалось как в свободном, так и в связанном с мембраной состояниях. Здесь колицин ведет себя аналогично убиквитину [42]. Данная работа — хороший пример применения широкого набора ЯМР экспериментов, что позволило перекрыть широкий частотный диапазон молекулярных движений. Однако, как и в подавляющем большинстве других случаев, анализ данных различных экспериментов велся

отдельно друг от друга, а их результаты сопоставлялись только на качественном уровне.

В работе [51] исследовалась молекулярная динамика коллагена при различных температурах в сухом и увлажненном виде с помощью ЯМР на ядрах ^{13}C естественного содержания. Измерялись усредненные движением константы $^{13}\text{C}-\text{H}$ диполь-дипольного взаимодействия с помощью эксперимента DIPSHIFT [48], а последовательность CODEX применялась для исследования динамики в миллисекундной области. Из-за RIDER-эффекта анализ интенсивностей линий спектра при различных временах смешивания в эксперименте CODEX проводился только для линий бета- и гамма-углеродов пролинов и гидроксипролинов, поскольку эти углероды не имеют ковалентно связанных азотов. Из-за того что в коллагене доля пролинов и гидроксипролинов намного больше, чем в большинстве других белков, линии углеродов этих остатков разрешены в спектре коллагена. В то же время степень АХС этих углеродов более чем в четыре раза меньше степени АХС карбоксильных углеродов, что уменьшает амплитуду спада интенсивности в τ_m -зависимости. Это в свою очередь приводит к необходимости большого числа накоплений для обеспечения достаточного отношения сигнал/шум. По этой причине в данной работе сравнивались только два времени смешивания — 1 мс и 100–200 мс, что могло дать информацию только о факте наличия медленного движения, но не о его времени корреляции. Эксперимент CODEX показал, что в сухом коллагене медленных движений практически нет, но гидроксипролины проявляют заметный уровень подвижности в миллисекундной области в увлажненном образце. Константы $^{13}\text{C}-\text{H}$ взаимодействия показали, что амплитуда движения в более высокочастотной области сильно зависит от гидратации белка и слабо — от температуры.

Довольно интересное применение эксперимента CODEX было описано в одной из самых последних работ группы М. Хонг [52]. В этой работе изучалась молекулярная динамика и агрегация антибиотического пептида протегрина-1, встроенного в фосфолипидный бислой, моделирующий биологическую мембранны. Антибиотические пептиды играют важную роль в иммунной системе многих организмов. Они разрушают клеточные стенки чужеродных микроорганизмов. При этом предполагается, что проявлять свою биологическую активность антибиотические пептиды могут только в агрегированном состоянии. Один из параметров, позволяющий судить о степени и природе агрегации пептидов, — это время корреляции вращения агрегатов в фосфолипидном бислое как целого.

Это время корреляции было определено с помощью эксперимента CODEX, который был проведен на карбонильном углероде одной из аминокислот протегрина-1 (для этого эксперимента пептид был селективно обогащен изотопом ^{13}C только в одной химической позиции). Это время корреляции оказалось равным 0,7 с. Пренебрежение RIDER-эффектом в данном случае вполне оправдано, поскольку время релаксации T_1 ядер ^{14}N , как минимум, на порядок короче.

Оказалось, что такую медленную реориентацию пептидных агрегатов невозможно описать с помощью простейшей гидродинамической модели, основанной на уравнении Стокса–Эйнштейна. В этом случае размер агрегатов должен быть неправдоподобно большим.

Наблюдаемое в эксперименте длинное время корреляции вращения агрегатов авторы объясняют образованием комплексов липидов с пептидными агрегатами и электростатическими взаимодействиями анионных фосфолипидных головок с катионными боковыми цепями аргининов в протегрине-1.

В заключение остановимся еще на одной работе, в которой для исследования внутримолекулярной динамики белка применялась твердотельная обменная ЯМР спектроскопия [53]. Главная особенность этой работы в том, что в ней используется одновременный количественный анализ релаксационных и обменных данных в рамках формализма корреляционных функций. Такой подход получил название SREDA (Simultaneous Relaxation and Exchange Data Analysis). Он основан на применении так называемого безмодельного подхода к анализу формы корреляционной функции молекулярного движения [54, 55]. Этот подход является одним из самых распространенных методов анализа ЯМР релаксационных данных. Согласно этому подходу межъядерное диполь-дипольное (или квадрупольное, если речь идет о релаксации квадрупольных ядер) взаимодействие делится на две части — усредняемую молекулярным движением и неусредняемую. К полному усреднению взаимодействия приводит только изотропное движение, которое может наблюдаться только в растворах или расплавах. А внутримолекулярные движения по очевидным причинам всегда в той или иной мере анизотропны. Неусредняемая доля взаимодействия обозначается как безразмерный параметр порядка S^2 , который меняется от нуля (соответствует изотропному движению) до единицы (отсутствие движения). Главное преимущество безмодельного подхода состоит в том, что он позволяет корректно описывать форму корреляционной функции движения без знания конкретных геометрических моделей движения, поэтому он и имеет название "безмодельный". В то же время геометрическая модель движения — крайне важная информация. Во-первых, зная модель, можно пересчитать безразмерный параметр порядка в амплитуду движения, выраженную в углах реориентации межъядерного вектора (или градиентом электрического поля для квадрупольных ядер), и, во-вторых, сама по себе модель может дать представление о природе и механизмах функционирования биомакромолекул. Однако определить модель движения, исходя только из стандартных измерений времен ЯМР релаксации, невозможно, поскольку эта процедура в принципе неоднозначная: одно и то же значение параметра анизотропии молекулярного движения может реализовываться различными геометрическими моделями при различных амплитудах.

Почти аналогичная ситуация и в обменной спектроскопии: экспериментально регистрируемая зависимость амплитуды линий спектра от времени смешивания по сути есть корреляционная функция реориентации тензора АХС, из которой можно определить время корреляции движения, но из которой нельзя однозначно определить геометрию реориентации тензора АХС. Хотя стоит заметить, что эксперимент CODEX позволяет проводить определенную селекцию различных моделей за счет измерений при различных периодах эволюции mT_R , как это было сделано в работе [46].

Кроме измерений при различных mT_R , подобную селекцию можно провести и на основании совместного

анализа обменных и релаксационных данных. Применяемый при анализе времен ЯМР релаксации безмодельный подход можно также применить и для формального описания зависимости амплитуды линий спектра от времени смешивания, т.е. корреляционной функции реориентации тензора АХС. Если межъядерный вектор и тензор АХС жестко связаны друг с другом, то логично ожидать, что характерное время молекулярного движения, наблюдаемое в обменном и релаксационном экспериментах, будет одним и тем же. Но параметры порядка по определению должны быть разными, поскольку они определяются разными формулами:

$$S_{\text{relax}}^2 = \int_0^\pi \int_0^{2\pi} \int_0^\pi \int_0^{2\pi} \rho(\theta_1, \varphi_1) \rho(\theta_2, \varphi_2) \times \\ \times \frac{3(\mathbf{n}(\theta_1, \varphi_1) \cdot \mathbf{n}(\theta_2, \varphi_2))^2 - 1}{2} d\varphi_1 d\theta_1 d\varphi_2 d\theta_2, \quad (37)$$

$$S_{\text{exch}}^2 = \int_0^\pi \int_0^{2\pi} \int_0^\pi \int_0^{2\pi} \rho(\theta_1, \varphi_1) \rho(\theta_2, \varphi_2) \times \\ \times \frac{I(\theta_1, \varphi_1, \theta_1, \varphi_1) + I(\theta_1, \varphi_1, \theta_2, \varphi_2)}{2I(\theta_1, \varphi_1, \theta_1, \varphi_1)} d\varphi_1 d\theta_1 d\varphi_2 d\theta_2, \quad (38)$$

где θ и φ — стандартные координаты полярной системы координат; $\rho(\theta, \varphi)$ — функция распределения ориентаций межъядерного вектора (главной оси тензора АХС), которая определяет собой геометрическую модель движения; $\mathbf{n}(\theta, \varphi)$ — единичный вектор, направление которого задается углами θ и φ ; $I(\theta_a, \varphi_a, \theta_b, \varphi_b)$ — амплитуда линии в обменном ЯМР спектре при условии, что до и после времени смешивания ориентация главной оси тензора АХС задавалась угловыми координатами (θ_a, φ_a) и (θ_b, φ_b) соответственно.

Величина $I(\theta_a, \varphi_a, \theta_b, \varphi_b)$ определяется на основании математического формализма, описанного выше. Селекция различных моделей движения (т.е. ориентационных функций распределения $\rho(\theta, \varphi)$) достигается тем, что модель движения должна удовлетворять результатам сразу двух экспериментов, что значительно сужает неопределенность в ее выборе, хотя, безусловно, и не исключает ее совсем. Стоит заметить, что подобный алгоритм полностью справедлив только при условии осевой симметрии тензора АХС и совпадении направлений межъядерного вектора и главной оси тензора АХС. Очень близки к выполнению этих условий ядра азота основной цепи в белках. Их тензор АХС близок к осевой симметрии, а разница между направлениями вектора N—H и главной осью тензора АХС составляет всего 20° [56], чем можно в первом приближении пренебречь.

Такой алгоритм анализа и был применен в работе [53] при исследовании динамики основной цепи барстара в свободном и связанном с биназой состояниях с помощью ЯМР на ядрах ^{15}N . Для уменьшения скорости спиновой диффузии, которая наблюдалась в totally ^{15}N -обогащенному белку ранее [30], барстар был обогащен только на 30 %, что привело к разбавлению спиновой системы и увеличению среднего расстояния между ядрами ^{15}N . Для того чтобы результаты обменного и релаксационного экспериментов можно было соотнести друг с другом, они должны быть чувствительны примерно к одному и тому же частотному диапазону молекулярной динамики. Очевидно, что измерение времени ЯМР релаксации T_1

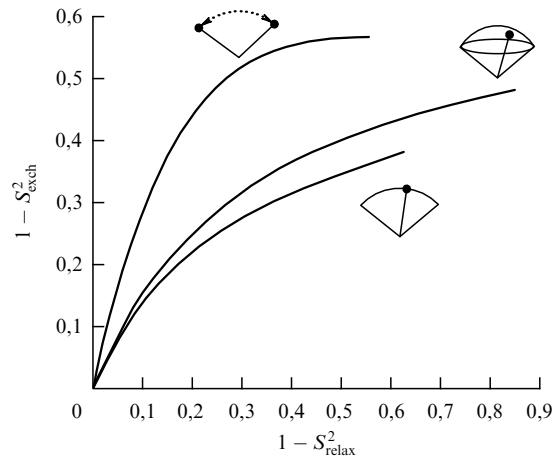


Рис. 6. Теоретически рассчитанная взаимозависимость параметров порядка, соответствующих обменному (импульсная последовательность CODEX) и релаксационному экспериментам, при различных угловых амплитудах движения для трех моделей движения: скачки между двумя равновероятными ориентациями (вверху), диффузионная реориентация в пределах конуса (в середине) и диффузионная реориентация в пределах планарного угла (внизу). Расчеты проведены для ядер ^{15}N при следующих значениях экспериментальных параметров: резонансная частота для азотов — 40,5 МГц, частота ВМУ — 3 кГц, период эволюции — 0,33 мс ($m = 1$; см. рис. 4), величина АХС ($\sigma_{11} - \sigma_{33}$) — 160 м.д.

для этой цели не подходит, поскольку это время определяется динамикой в наносекундном диапазоне, в то время как обменная спектроскопия дает информацию о миллисекундных движениях (хотя времена релаксации T_1 в этой работе также измерялись для исследования высокочастотной динамики). Поэтому для такого исследования может подойти только измерение времени релаксации во вращающейся системе координат $T_{1\rho}$, которое обычно чувствительно к движениям со временем корреляции порядка десятков-сотен микросекунд. В данной работе измерялись времена релаксации $T_{1\rho}$ в наклоненной системе координат, т.е. с применением отстройки от резонанса поля спин-лока [57]. Этот способ измерения позволяет увеличить поле спин-лока без увеличения мощности передатчика и, как следствие, исключить дополнительный спин-спиновый вклад в скорость релаксации, который зачастую делает измерение времени релаксации $T_{1\rho}$ бесполезным для исследования молекулярной динамики [58].

Для анализа данных в этой работе были теоретически рассчитаны параметры порядка S_{relax}^2 и S_{exch}^2 (см. (37) и (38)) для нескольких моделей движения при различных угловых амплитудах. Оказалось, что если выразить один параметр порядка через другой, то эта зависимость будет разной для разных моделей, что показано на рис. 6. Следует иметь в виду, что если S_{relax}^2 определяется только самим движением, то S_{exch}^2 , кроме этого, зависит и от параметров тензора АХС, резонансной частоты и периода эволюции обменного эксперимента. Поэтому при изменении какого-либо из этих параметров вид кривых на рис. 6 также изменится. Как видно из этого рисунка, различие между моделями наиболее заметно при высоких амплитудах движения (низких параметрах порядка), а если амплитуда мала, то отличить одну модель от другой невозможно из-за экспериментальной ошибки.

Совместный анализ релаксационных и обменных данных показал, что основная цепь барстара участвует в двух типах движения со временами корреляции порядка $10^{-9} - 10^{-7}$ с и $10^{-3} - 10^{-2}$ с. Образование комплекса барстара с биназой приводит к уменьшению амплитуд обоих движений. Что же касается различных моделей движения, то анализ показал, что лучше всего экспериментальные данные описывает модель колебаний в конусе, хотя экспериментальная ошибка не позволила провести однозначный выбор в пользу той или иной модели. Поскольку при неспецифическом изотопном обогащении невозможно получить высокое разрешение в одномерном твердотельном ЯМР спектре, полученные данные относятся к усредненной по всем аминокислотным звеньям динамике. С этой точки зрения селективное обогащение белка и сайт-специфическое соотнесение линий спектра, конечно, значительно повысило бы ценность молекулярно-динамической информации. Но такие эксперименты из-за более низкого ЯМР сигнала сопряжены с длительным временем проведения измерений и потому очень трудоемки.

4. Заключение

В результате ряда методических модификаций одномерная обменная ЯМР спектроскопия твердого тела с ВМУ стала одним из мощных и информативных экспериментальных средств изучения динамики в различных молекулярных системах. Информация, которая может быть получена с помощью этого ЯМР эксперимента, является во многом уникальной.

Эта уникальность обусловлена, во-первых, диапазоном времен корреляции молекулярной динамики, который простирается от долей миллисекунды до единиц-десятков секунд. До недавнего времени движения этого диапазона могли изучаться в основном только с помощью таких непрямых методов, как, например, метод водородного обмена. Этот диапазон является особенно важным при исследовании биомакромолекул, поскольку он характерен для многих биологических процессов.

Во-вторых, уникальной является возможность получения корреляционной функции реориентационного движения напрямую из эксперимента, без использования каких-либо моделей. В случае ЯМР релаксации или анализа формы линии ЯМР спектра определение формы корреляционной функции практически всегда связано с использованием тех или иных приближений или допущений. Наконец, обменная спектроскопия позволяет исследовать зависимость не только от времени смешивания, но и от периода эволюции, что позволяет получать гораздо более определенную по сравнению с ЯМР релаксацией и анализом формы линии информацию о геометрических моделях молекулярных движений. Эта возможность анализа геометрии молекулярного движения может быть значительно усиlena при совместном количественном анализе данных по обменной и релаксационной ЯМР спектроскопии [53].

Основной методический недостаток обменной ЯМР спектроскопии состоит в том, что она в меньшей мере по сравнению с релаксационными экспериментами приспособлена для изучения низкоамплитудных молекулярных движений. В случае релаксации уменьшение амплитуды движения приводит к удлинению времени релаксации, которое, тем не менее, может быть изме-

reno с такой же точностью, что и более короткое время релаксации, а в обменных экспериментах детектирование низкоамплитудного движения требует практически прецизионного измерения амплитуд линий ЯМР спектра, что далеко не всегда достижимо в реальных экспериментах.

Первые и пока еще не очень многочисленные примеры применения твердотельной обменной спектроскопии для изучения низкочастотной конформационной динамики белков показали, что в разных белках и в разных условиях эта динамика проявляется по-разному. Очевидно, что амплитуда этой динамики может зависеть от гидратации [30, 51] белка и от его связывания с субстратом [53]. Важно отметить, что в таких белках, как колицин и убиквитин, внутренняя динамика в миллисекундном диапазоне не наблюдалась совсем [42, 47]. С одной стороны, это может объясняться спецификой этих белков, а с другой — той методической проблемой, которая была отмечена выше. Этот вопрос полностью пока не прояснен. Стоит отметить, что последовательность CODEX в последние несколько лет с успехом использовалась при исследовании динамики синтетических полимеров, где миллисекундные движения фиксировались без особых проблем [59–62]. Однако синтетические полимеры обычно не имеют жесткой пространственной структуры, присущей глобулярным белкам, и потому амплитуды медленных движений в них могут быть значительно больше, что облегчает их наблюдение посредством обменного эксперимента.

В заключение остановимся на тех направлениях в экспериментальных ЯМР исследованиях динамики белков, в которых обменная твердотельная спектроскопия до настоящего времени не использовалась, но где ее применение может быть особенно продуктивным.

Во-первых, до сих пор не проведено ни одного эксперимента на селективно изотопно-меченом белке с сай́т-специфическим разрешением ЯМР спектра. Исключение составляет только одна работа [52], но в ней селективное обогащение не имело особого смысла для обменной спектроскопии, поскольку она применялась для регистрации вращения пептидных агрегатов как целого. Селективно меченные белки уже давно используются как в релаксационных ЯМР экспериментах [63, 64], так и в экспериментах по анализу формы линии [63–66], хотя число таких работ пока очень невелико. Получение не усредненной по группе атомов, а высоко-локализованной динамической информации, безусловно, представляет намного больший интерес для понимания свойств и природы биологического функционирования белков.

Во-вторых, пока не было проведено экспериментов, в которых бы осуществлялся одновременный количественный анализ обменных данных и формы ЯМР спектра статического или медленно врашающегося под магнитным углом образца. Как и в случае метода SREDA [53], такой анализ тоже наверняка мог бы дать более определенную информацию о природе и геометрии медленных молекулярных движений. Также представляется перспективной модификация подхода SREDA, в которой бы одновременно с временами ЯМР релаксации анализировались зависимости не только от времени смешивания, но и от длительности периода эволюции. Наконец, самую детальную информацию о природе молекулярных движений мог бы дать совместный анализ данных

сразу всех трех ЯМР методов — обмена, анализа формы линии и релаксации. Таких работ пока не было.

В-третьих, до сих пор не было проведено ни одного твердотельного обменного ЯМР эксперимента в белках на ядрах дейтерия. Эксперименты с использованием дейтерия могут быть довольно интересными, поскольку дейтерий обладает наиболее анизотропным тензором АХС, и потому эти ядра должны быть наиболее чувствительны к низкоамплитудным движениям. Хотя время спин-решеточной релаксации дейтерия относительно короткое (обычно сотни миллисекунд), что несколько сужает частотный диапазон исследований, ядра дейтерия наиболее оптимальны для одновременного экспериментального изучения молекулярной динамики всеми тремя ЯМР методами, упомянутыми выше.

Основная проблема, которая препятствует проведению всех этих экспериментов, — их дороговизна и длительность. Время, необходимое для проведения таких комплексных экспериментов, может измеряться месяцами (здесь имеется в виду только время работы ЯМР спектрометра, без учета времени, затрачиваемого на обработку результатов). Такого рода исследования могут проводиться только на современных высокопольных спектрометрах с резонансной частотой для протонов не ниже 500–600 МГц. Соответственно на настоящий момент такие исследования может позволить себе очень небольшое количество лабораторий. Тем не менее, по нашему убеждению, именно такой комплексный подход может обеспечить в обозримом будущем прорыв в этой области молекулярной биофизики.

Автор выражает благодарность своему коллеге и другу Детлефу Райхерту (Detlef Reichert), без совместной многолетней работы с которым этот обзор не мог бы быть написан.

Список литературы

1. Perutz M et al. *Nature* **185** 416 (1960)
2. Wüthrich K *NMR of Proteins and Nucleic Acids* (New York: Wiley, 1986)
3. Karplus M *J. Phys. Chem. B* **104** 11 (2000)
4. Buckle A M, Schreiber G, Fersht A R *Biochemistry* **33** 8878 (1994)
5. Wong K-B, Fersht A R, Freund S M V *J. Mol. Biol.* **268** 494 (1997)
6. Gryk M R, Jardetzky O J. *Mol. Biol.* **255** 204 (1996)
7. Gabel F et al. *Quart. Rev. Biophys.* **35** 327 (2002)
8. Parak F G *Rep. Prog. Phys.* **66** 103 (2003)
9. Sinha N, Smith-Gill S J *Prot. Pept. Lett.* **9** 367 (2002)
10. Wand A J *Nature Struct. Biol.* **8** 926 (2001)
11. Kempf J G, Loria J P *Cell Biochem. Biophys.* **37** 187 (2003)
12. Palmer A G (III), Williams J, McDermott A *J. Phys. Chem.* **100** 13293 (1996)
13. Palmer A G (III), Kroenke C D, Loria J P *Methods Enzymol.* **339** 204 (2001)
14. Abragam A *The Principles of Nuclear Magnetism* (Oxford: Clarendon Press, 1961)
15. Slichter C P *Principles of Magnetic Resonance* 2nd ed. (Berlin: Springer-Verlag, 1978)
16. Schmidt-Rohr K, Spiess H *Multidimensional Solid-State NMR and Polymers* (London: Academic Press, 1994)
17. Jeener J et al. *J. Chem. Phys.* **71** 4546 (1979)
18. Hagemeyer A et al. *Chem. Phys. Lett.* **167** 583 (1990)
19. Andrew E R, Bradbury A, Eades R G *Nature* **182** 1659 (1958)
20. Szeverenyi N M, Sullivan M J, Maciel G E *J. Magn. Reson.* **47** 462 (1982)
21. Pines A, Gibby M G, Waugh J S *J. Chem. Phys.* **56** 1776 (1972)
22. Luz Z, Tekely P, Reichert D *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **41** 83 (2002)
23. Gérardy-Montouillout V et al. *J. Magn. Reson. A* **123** 7 (1996)
24. Reichert D et al. *J. Magn. Reson.* **125** 245 (1997)
25. Tekely P et al. *J. Magn. Reson.* **145** 173 (2000)
26. Favre D E, Schaefer D J, Chmelka B F *J. Magn. Reson.* **134** 261 (1998)
27. Reichert D et al. *J. Magn. Reson.* **146** 311 (2000)
28. deAzevedo E et al. *J. Am. Chem. Soc.* **121** 8411 (1999)
29. deAzevedo E R et al. *J. Chem. Phys.* **112** 8988 (2000)
30. Krushelnitsky A et al. *J. Magn. Reson.* **138** 244 (1999)
31. Siminovitch D J *Biochem. Cell Biol.* **76** 411 (1998)
32. Rupley J, Careri G *Adv. Prot. Chem.* **41** 37 (1991)
33. Belton P S *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **61** 61 (1994)
34. Torchia D A *J. Magn. Reson.* **30** 613 (1978)
35. Weliky D P, Tycko R *J. Am. Chem. Soc.* **118** 8487 (1996)
36. Saalwächter K, Schmidt-Rohr K *J. Magn. Reson.* **145** 161 (2000)
37. McDermott A et al. *J. Biomol. NMR* **16** 209 (2000)
38. McDermott A, in *Protein NMR for the Millennium* (Biological Magnetic Resonance, Vol. 20, Eds N R Krishna, L J Berliner) (New York: Kluwer Acad./Plenum Publ., 2003) p. 103
39. Pauli J et al. *ChemBioChem* **2** 272 (2001)
40. Castellani F et al. *Nature* **420** 98 (2002)
41. Reichert D et al. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **13** 137 (1998)
42. deAzevedo E R, Kennedy S B, Hong M *Chem. Phys. Lett.* **321** 43 (2000)
43. Hong M, Jakes K *J. Biomol. NMR* **14** 71 (1999)
44. Hong M *J. Magn. Reson.* **139** 389 (1999)
45. Ernst M et al. *J. Am. Chem. Soc.* **126** 4764 (2004)
46. Kennedy S B et al. *Macromolecules* **34** 8675 (2001)
47. Huster D, Xiao L, Hong M *Biochemistry* **40** 7662 (2001)
48. Kolbert A C et al., in *M multinuclear Magnetic Resonance in Liquids and Solids, Chemical Applications* (NATO ASI Ser., Ser. C, No. 322, Eds P Granger, R K Harris) (Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1990) p. 339
49. Schmidt-Rohr K, Clauss J, Spiess H W *Macromolecules* **25** 3273 (1992)
50. van Rossum B-J et al. *J. Am. Chem. Soc.* **122** 3465 (2000)
51. Reichert D et al. *Magn. Reson. Chem.* **42** 276 (2004)
52. Buffy J J et al. *Biochemistry* **42** 13725 (2003)
53. Krushelnitsky A G, Hempel G, Reichert D *Biochim. Biophys. Acta: Prot. Proteom.* **1650** 117 (2003)
54. Lipari G, Szabo A *J. Am. Chem. Soc.* **104** 4546 (1982)
55. Lipari G, Szabo A *J. Am. Chem. Soc.* **104** 4559 (1982)
56. Oas T G et al. *J. Am. Chem. Soc.* **109** 5956 (1987)
57. Krushelnitsky A et al. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **22** 423 (2002)
58. Van der Hart D L, Garroway A N *J. Chem. Phys.* **71** 2773 (1979)
59. Bonagamba T J et al. *J. Polymer Sci. B: Polymer Phys.* **39** 2444 (2001)
60. Miyoshi T, Pascui O, Reichert D *Macromolecules* **35** 7178 (2002)
61. Pascui O, Beiner M, Reichert D *Macromolecules* **36** 3992 (2003)
62. deAzevedo E R et al. *J. Chem. Phys.* **119** 2923 (2003)
63. Tamura A et al. *Protein Sci.* **5** 127 (1996)
64. Cole H B R, Torchia D A *Chem. Phys.* **158** 271 (1991)
65. Williams J C, McDermott A E *Biochemistry* **34** 8309 (1995)
66. Shaw W J et al. *J. Am. Chem. Soc.* **122** 7118 (2000)

Exchange solid state NMR spectroscopy: application to the large-scale conformational dynamics of biopolymers

A.G. Krushel'nitsky

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Lobachevskogo 2/31, 420111 Kazan, Russian Federation

Tel. (7-8432) 31-90 37. Fax (7-8432) 92-73 47

E-mail: krushelnitsky@mail.knc.ru

The exchange NMR experiment compares NMR frequencies before and after the so-called mixing time, thereby gaining molecular dynamics information on millisecond and second correlation time scales. Although exchange experiments on solutions have a long history, conducting them on solids presents methodological challenges, and it is only by the late 1990s of the last century that solid state exchange spectroscopy matured to the level where such complex objects as biopolymers can be addressed. In this review major methodological advances in the field are examined, and the application of exchange NMR experiments to conformational molecular dynamics of solid state biopolymers is described.

PACS numbers: **76.60.-k, 82.56.-b, 82.56.Pp**

Bibliography — 66 references

Received 8 December 2004

Uspekhi Fizicheskikh Nauk **175** (8) 815–832 (2005)

Physics – Uspekhi **48** (8) (2005)