

MAGNETYCZNY REZONANS JĄDROWY W BADANIACH STRUKTURALNYCH BIOMOLEKUŁ NA PRZYKŁADZIE BADANIA MODELOWYCH UKŁADÓW HELIKALNYCH

Marta Oleszczuk

Department of Biochemistry and Biophysics, Stockholm University,
Arrheniusvagen 12a, 106 91 Stockholm, Sweden

tel: +46 0816 2461, e-mail: martol@dbb.su.se

Otrzymano 28.04.2006; zaakceptowany 21.06.2006; zamieszczony 31.07.2006

STRESZCZENIE

Magnetyczny rezonans jądrowy (NMR) jest dogodnym narzędziem w strukturalnych badaniach biomolekuł. Umożliwia badanie nie tylko dużych cząsteczek, takich jak białka, posiadających sztywną strukturę, ale także małych peptydów występujących w roztworze w równowadze konformacyjnej. W pracy zamieszczono podstawowe informacje na temat zjawiska magnetycznego rezonansu jądrowego i jego zastosowań do tego typu badań oraz krótki opis najczęściej stosowanych metod obliczeniowych prowadzących do uzyskania struktury przestrzennej biomolekuł. Za przykład ilustrujący praktyczne zastosowanie tej metody posłużyły badania modelowych układów helikalnych wykonane w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie.

SŁOWA KLUCZOWE: magnetyczny rezonans jądrowy (NMR), białko, peptyd, helisa

ABSTRACT

NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE IN THE STRUCTURAL INVESTIGATION OF BIOMOLECULES: APPLICATION IN THE STUDY OF MODEL HELICAL SYSTEMS

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) is a powerful tool in the structural investigation of biomolecules. It enables the study not only on large macromolecules such as proteins with rigid conformation, but also on small peptides evincing conformational equilibrium in solution. In this paper the basic information about nuclear magnetic resonance and a short description of the most commonly used methods for calculating 3D structures of biomolecules are presented. Structural investigations of a model helical system carried out at the Institute of Biochemistry and Biophysics PAS in Warsaw are included to exemplify the protocols.

KEYWORDS: Nuclear Magnetic Resonance (NMR), protein, peptide, helix

1. Magnetyczny rezonans jądrowy

Magnetyczny rezonans jądrowy jest obok krystalografii podstawowym narzędziem w badaniach strukturalnych białek i peptydów [1]. Zaletą tej metody badawczej jest możliwość określenia konformacji w roztworze nie tylko białek, które mają zazwyczaj dobrze zdefiniowaną strukturę, ale również niewielkich peptydów, których struktura w roztworze nie jest sztywna i które zwykle występują w równowadze konformacyjnej. W przypadku powolnych przejść konformacyjnych (0.1s-1.0s) obserwuje się oddzielne zestawy sygnałów w widmach NMR odpowiadające poszczególnym konformerom. Szybkie zmiany konformacyjne o czasach życia ns-ps prowadzą do uśredniania widma i jednego zestawu sygnałów odpowiadającego uśrednionej konformacji [2,3]. Zastosowanie magnetycznego rezonansu jądrowego umożliwia również badanie dynamiki układów biologicznych w szerokim przedziale ruchów molekularnych [4,5,6].

1.1. Zjawisko magnetycznego rezonansu jądrowego

Warunkiem zaistnienia zjawiska rezonansu magnetycznego jest posiadanie przez jądra danego izotopu niezerowego spinu I.

Spiny jądrowe umieszczone w stałym i jednorodnym zewnętrznym polu magnetycznym $B_0=[0,0,B_0]$ mogą przyjmować $2I+1$ orientacji, a rzut spinu na kierunek wyznaczony przez pole magnetyczne (oś z) wynosi $I_z=m$ (gdzie m - kwantowa liczba magnetyczna $m = -I, -I+1, \dots, I-1, I$).

Swobodny spin jądrowy umieszczony w polu B_0 może przyjmować dyskretne wartości energii (poziomy energetyczne) $E(m)=-\gamma\hbar m B_0$ (gdzie γ - współczynnik magnetyczny charakterystyczny dla danego rodzaju jądra, \hbar - zredukowana stała Plancka) [7,8]. W stanie równowagi termodynamicznej z otoczeniem obsadzenia poziomów są zgodne z rozkładem Boltzmanna i są proporcjonalne do czynnika: $\exp(-E(m)/kT)$. W temperaturze pokojowej obsadzenia różnią się nieznacznie (poziom o niższej energii ma większą populację). Nawet niewielkie różnice obsadzeń, rzędu 10^{-6} , prowadzą do powstania makroskopowego momentu magnetycznego ξ . Moment magnetyczny jednostki objętości V nazywa się magnetyzacją $M=\xi/V$.

Wektor momentu magnetycznego jądra ($\mu=\gamma\hbar I$), które jest umieszczone w polu magnetycznym B_0 zgodnym z wybranym kierunkiem (np. osi z, $B_0=[0,0,B_0]$) porusza się w tym polu zgodnie z równaniem [8,9]:

$$\frac{d\mu}{dt} = \gamma \mu \times B_0 \quad \text{Równanie 1}$$

Równanie to jest łatwiej rozwiązywać w układzie współrzędnych (x' , y' , z') wirującym z prędkością kątową ω wokół wybranego kierunku. Po transformacji z laboratoryjnego układu (x , y , z) do wirującego (x' , y' , z') dostajemy:

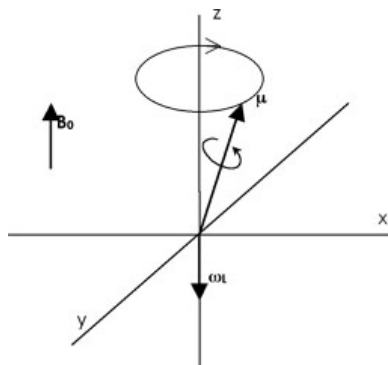
$$(\partial \mu / \partial t)_{(x'y'z')} = (d\mu / dt)_{(xyz)} + \mu \times \omega = \gamma \mu \times B_0 + \mu \times \omega = \gamma \mu \times B' \quad \text{Równanie 2}$$

B' jest efektywnym polem magnetycznym działającym na wektor μ i wynosi:

$$B' = B_0 + \omega / \gamma \quad \text{Równanie 3}$$

Wektor momentu magnetycznego μ umieszczony w polu B_0 wykonuje precesję wokół osi wyznaczonej przez wektor tego pola (w opisywanym przypadku wokół osi z). Prędkość kątową tego ruchu nazywa się częstością Larmora (Ryc. 1):

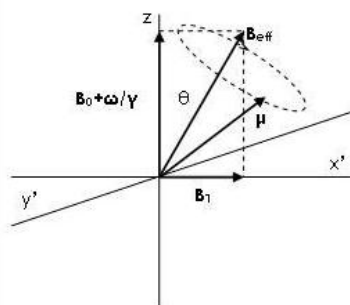
$$\omega_L = -\gamma B_0 \quad \text{Równanie 4}$$



Ryc. 1. Precesja magnetycznego momentu jądrowego μ w stacjonarnym układzie współrzędnych.

Jeśli do stałego, jednorodnego pola B_0 dodamy wirujące w płaszczyźnie prostopadłej do B_0 z prędkością kątową ω pole B_1 to efektywne pole magnetyczne B_{eff} w takim układzie przyjmuje postać $B_{\text{eff}} = B_0 + \frac{\omega}{\gamma} + B_1$. Spin lub

układ spinów wykonuje wówczas precesję wokół pola B_{eff} (Ryc. 2).



Ryc. 2. Efektywne pole magnetyczne B_{eff} w wirującym układzie współrzędnych oraz precesja momentu magnetycznego μ wokół kierunku tego pola (prędkość wirowania pola B_1 jest bliska częstości Larmora) [10].

Pole $B_1 = [B_1 \cos(\omega t), -B_1 \sin(\omega t), 0]$ wiruje w płaszczyźnie xy zgodnie z ruchem wskazówek zegara; w układzie laboratoryjnym jest to pole zmienne w czasie, natomiast w układzie wirującym z częstością ω jest polem stałym.

Jeżeli częstość ω wirowania pola zmiennego jest bliska częstości Larmora ω_L , mamy do czynienia ze zjawiskiem absorpcji rezonansowej.

W układzie przedstawionym powyżej można wzbudzać przejścia między poziomami energetycznymi $E(m)$ napromieniowując próbkę promieniowaniem o częstościach rezonansowych, których energia $E = h\nu = E(m)$; częstości ν leżą w przedziale częstości radiowych od kilku do kilkuset MHz. Częstość promieniowania pochłanianego przez próbkę zależy od rodzaju jądra charakteryzującego się współczynnikiem magnetogirycznym γ oraz od indukcji zewnętrznego pola magnetycznego B_0 :

$$\nu = \gamma B_0 / 2\pi \quad \text{Równanie 5}$$

gdzie:

ν - częstość promieniowania elektromagnetycznego absorbowanego

γ - współczynnik magnetogiryczny jądra

B_0 - indukcja zewnętrznego, stałego pola magnetycznego

Po wytrąceniu ze stanu równowagi termodynamicznej magnetyzacja próbki podlega procesom relaksacyjnym, aby powrócić do stanu wyjściowego. W zjawisku **relaksacji podłużnej** (T_1), związanej ze składową M_z magnetyzacji, mamy do czynienia z oddawaniem do otoczenia energii zaabsorbowanej podczas pobudzenia układu spinowego. Zatem T_1 jest stałą czasową powrotu składowej magnetyzacji równoległej do wektora B_0 do wartości równowagowej M_0 (relaksacja podłużna, spin-sieć). Oprócz relaksacji podłużnej w opisie układu spinowego mamy do czynienia ze zjawiskiem **relaksacji poprzecznej** (T_2), opisującym zanik składowej magnetyzacji M_{xy} (relaksacja poprzeczna, spin-spin). Wielkości T_1 i T_2 zostały wprowadzone dla prawidłowego opisu zmiany magnetyzacji w czasie⁷.

Zachowanie magnetyzacji M pod wpływem pól magnetycznych B_0 i B_1 oraz procesów relaksacji opisują równania Blocha:

$$dM_x/dt = \gamma(M_y B_0 - M_z B_1 \sin(\omega t)) - M_x/T_2 \quad \text{Równanie 6}$$

$$dM_y/dt = -\gamma(M_x B_0 - M_z B_1 \cos(\omega t)) - M_y/T_2 \quad \text{Równanie 7}$$

$$dM_z/dt = -\gamma(M_x B_1 \sin(\omega t) + M_y B_1 \cos(\omega t)) - (M_z - M_0)/T_1 \quad \text{Równanie 8}$$

W wirującym układzie współrzędnych równania te przyjmują postać:

$$dM_x'/dt = \Delta\omega M_y' M_x'/T_2 \quad \text{Równanie 9}$$

$$dM_y'/dt = \Delta\omega M_x' M_y'/T_2 + \omega_1 M_z' \quad \text{Równanie 10}$$

$$dM_z'/dt = \omega_1 M_y' - (M_z' - M_0)/T_1 \quad \text{Równanie 11}$$

gdzie $\Delta\omega = (\omega_r - \omega_0)$ zaś $\omega_1 = \Delta B_1$.

Wymiennie używa się określenia szybkości relaksacji R_i oraz czasu relaksacji T_i . Dla tych dwóch wielkości zachodzi związek $T_i = 1/R_i$.

1.2. Oddziaływanie spinu z otoczeniem

Oddziaływania magnetyczne spinu z otoczeniem można podzielić na bezpośrednie (przekazywane przez przestrzeń) i pośrednie (przekazywane przez elektrony). Najważniejsze z oddziaływań pośrednich to ekranowanie (spin z polem magnetycznym) oraz oddziaływanie skalarnie (spin z innym spinem). Wśród oddziaływań bezpośrednich wyróżnia się oddziaływanie zeemanowskie (spin z polem magnetycznym) oraz oddziaływanie dipolowe (spin z innym spi-

nem) [10]. W opisie oddziaływań spinu z otoczeniem występują ponadto oddziaływania elektryczne, z których najważniejsze to oddziaływanie kwadrupolowe mające miejsce w przypadku jąder o spinie większym niż $\frac{1}{2}$. Takie jądra posiadają moment kwadrupolowy eQ . Obdarzone są nim na przykład jądra izotopu ^{14}N występujące w przyrodzie w przewodzie (naturalna zawartość izotopowa wynosi 99,6%). Sygnały izotopu ^{14}N są trudne do obserwacji. Niedogodność tę można usunąć przez izotopowe znakowanie materiału badawczego zastępując jądra ^{14}N przez jądra izotopu ^{15}N (naturalna zawartość izotopowa 0,4%) posiadającego spin $\frac{1}{2}$. Ze względu na efekt poszerzenia linii spektralnych w widmie oddziaływanie kwadrupolowe jest niekorzystne i nie będzie tu omawiane.

Poniżej zostaną omówione podstawowe własności ekranowania, oddziaływania skalarnego oraz oddziaływania dipolowego.

1.2.1. Stała ekranowania i przesunięcie chemiczne

Zewnętrzne pole magnetyczne indukuje ruch chmury elektronów wokół jądra, co powoduje, zgodnie z regułą Lenza, powstanie momentu magnetycznego skierowanego przeciwnie do pola B_0 . W konsekwencji natężenie lokalnego pola magnetycznego wokół jądra jest zmniejszone o wielkość zwaną stałą ekranowania σ [7,11]:

$$B_{\text{lok}} = B_0(1 - \sigma) \quad \text{Równanie 12}$$

Równanie na częstość Larmora przyjmuje postać:

$$\omega_L = -\gamma(1 - \sigma)B_0 \quad \text{Równanie 13}$$

Budowa cząsteczki determinuje lokalny rozkład gęstości elektronowej wokół jądra. Ponieważ rozkłady gęstości różnią się, więc lokalne pole magnetyczne także nie jest takie samo wokół wszystkich jąder. Dlatego też stałe ekranowania dla różnych chemicznych jąder atomów tego samego izotopu różnią się. Bezpośredni pomiar stałej ekranowania jest trudny i dlatego w celu zwiększenia dokładności wyników ilościowych w zakresie częstości rezonansowych danego izotopu zdefiniowano wielkość zwaną przesunięciem chemicznym δ (dla wygody operowania liczbami wprowadzono mnożnik 10^6 i jednostkę ppm - *parts per million*):

$$\delta = \left(\frac{\nu - \nu_0}{\nu_0} \right) \times 10^6 \quad \text{Równanie 14}$$

gdzie:

ν - częstość rezonansowa danego jądra

ν_0 - częstość rezonansowa substancji wzorcowej

Uwzględniając poprzednie zależności dostaje się relację między przesunięciem chemicznym i stałą ekranowania:

$$\delta = \frac{(1 - \sigma) - (1 - \sigma_0)}{(1 - \sigma_0)} \times 10^6 = \frac{\sigma_0 - \sigma}{1 - \sigma_0} \times 10^6 \approx \sigma_0 - \sigma \times 10^6$$

Równanie 15

gdzie:

σ - stała ekranowania danego jądra

σ_0 - stała ekranowania substancji wzorcowej

Na wartość przesunięcia chemicznego ma wpływ wiele czynników takich jak: elektroujemność i podatność magnetyczna sąsiednich atomów lub grup atomów, oddziaływanie z cząsteczkami rozpuszczalnika, rodzaj rozpuszczalnika czy lokalna konformacja cząsteczki.

W przypadku białek i peptydów poszczególne grupy jąder wykazują charakterystyczne wartości przesunięć chemicznych w zależności od rodzaju reszty aminokwasowej. Przesunięcia chemiczne protonów amidowych łańcucha głównego wykazują niewielką zależność od typu reszty aminokwasowej i wynoszą średnio 8.3 ± 0.7 ppm [12]. Niemniej jednak przedział przesunięć chemicznych protonów amidowych jest duży, co jest przydatne przy przypisywaniu sygnałów w widmach NMR białek. Przesunięcia chemiczne jąder azotów amidowych ^{15}N nie są specyficzne, jednak wykazują dobrą dyspersję. Wykorzystywane jest to w widmach korelacyjnych $^1\text{H}/^{15}\text{N}$.

1.2.2. Sprężenie skalarnie

Oddziaływanie między poszczególnymi jądrami przekazywane przez elektrony wiązań walencyjnych jest określane mianem sprężenia spinowo-spinowego bądź skalarnego. Energia tego oddziaływania jest proporcjonalna do iloczynu skalarnego momentów magnetycznych oddziałujących jąder:

$$E = J_{AX} \mathbf{I}_A \cdot \mathbf{I}_X \quad \text{Równanie 16}$$

gdzie:

$I_i = \mu_i / \gamma \hbar$ spin jądra i

J_{AX} - stała sprężenia skalarnego

Oddziaływanie spin-spin jest niezależne od zewnętrznego pola magnetycznego, natomiast jego zasięg silnie zależy od lokalnej konformacji cząsteczki i od rodzaju oddziałujących jąder, a także jąder pośredniczących i znajdujących się na nich podstawników.

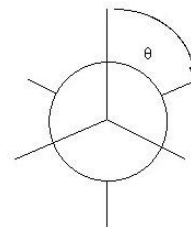
W widmie NMR sprężenie skalarnie przejawia się rozszczepieniem (na składowe multipletu) sygnału jądra ze względu na oddziaływanie z innym jądrem lub jądrami. Sprężenia przez dwa wiązania 2J nazywane są sprężeniami geminalnymi natomiast przez 3 wiązania 3J - wicynalnymi.

Przy rozpatrywaniu oddziaływań o zasięgu dalszym niż przez jedno wiązanie pojawia się wpływ czynników stereochemicznych. Równanie Karplusa [13] opisuje zależność stałej wicynalnego sprężenia od kąta torsyjnego (Ryc. 3 i 4):

$$^3J = A \cos^2 \theta + B \cos \theta + C \quad \text{Równanie 17}$$

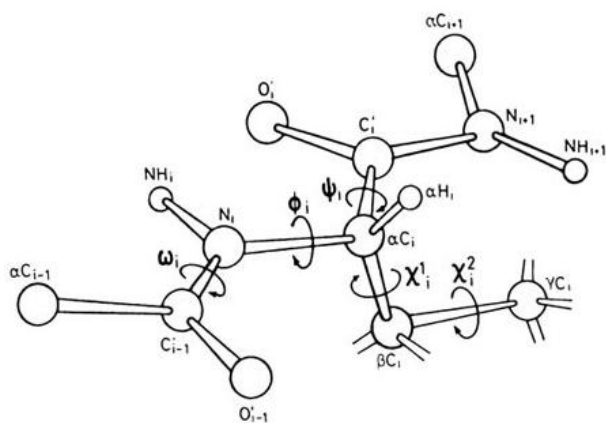
gdzie:

A, B, C - parametry zależne od rodzaju stałej sprężenia



Ryc. 3. Projekcja Newmana definiująca kąt torsyjny θ występujący w równaniu 17 [14].

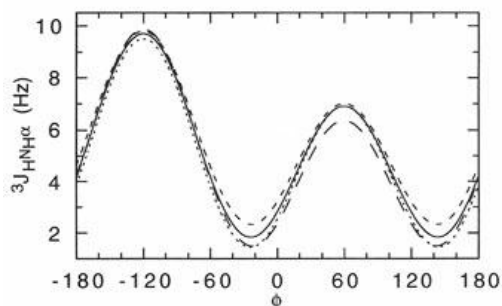
Wykorzystanie wicynalnej stałej sprężenia do wyznaczenia wartości związanego z nią kąta torsyjnego jest pomocnym narzędziem w określaniu lokalnej konformacji cząsteczki. Na Ryc. 4 przedstawiono definicję poszczególnych kątów dwuściennych w białkach.



Ryc. 4. Standardowa nomenklatura atomów i kątów torsyjnych w łańcuchu polipeptydowym [15].

Z analizy wartości kątów torsyjnych Φ , Ψ i ω uzyskuje się informacje o konformacji łańcucha głównego natomiast kąty φ determinują konformacje łańcuchów bocznych poszczególnych reszt aminokwasowych w cząsteczce. Ze względu na właściwości wiązania peptydowego kąt ω zazwyczaj jest bliski 180° (konformacja *trans*) a niekiedy 0° (konformacja *cis*), co zmniejsza liczbę stopni swobody konformacyjnej łańcucha głównego.

Kąt torsyjny Φ jest opisany przez sześć stałych sprzężeń: $^3J_{\text{H}\alpha\text{-H}\text{N}}$, $^3J_{\text{C}\beta\text{-H}\text{N}}$, $^3J_{\text{C}'\text{-H}\text{N}}$, $^3J_{\text{C}'(\text{i})\text{-H}\alpha(\text{i}+1)}$, $^3J_{\text{C}'(\text{i})\text{-C}'(\text{i}+1)}$, $^3J_{\text{C}'(\text{i})\text{-C}\beta(\text{i}+1)}$. Najwygodniej jest posługiwać się homojądrowymi stałymi sprzężenia $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ gdyż nie wymaga to izotopowego znakowania białka. Najlepiej poznaną i najczęściej używaną jest homojądrowa stała $^3J_{\text{H}\alpha\text{-H}\text{N}}$ między dwoma protonami tej samej reszty aminokwasowej [16]. Stosowane są różne parametryzacje równania Karplusa dla tej stałej, różnice między nimi obrazuje Ryc. 5.



Ryc. 5. Krzywe Karplusa opisujące zależność stałej sprzężenia $^3J_{\text{H}\alpha\text{-H}\text{N}}$ od kąta torsyjnego Φ ; ($\theta = |\Phi - 60^\circ|$) (równanie 17). Przedstawiono różnice między krzywymi w zależności od parametryzacji: (—) A=6.4, B=-1.4, C=1.9; (---) A=6.0, B=-1.4, C=2.4; (····) A=6.7, B=-1.3, C=1.5; (-·-·) A=6.51, B=-1.76, C=1.612.

Kąt torsyjny Ψ może być opisany przez trzy wicynalne stałe sprzężenia: $^3J_{\text{H}\alpha\text{-N}}$, $^3J_{\text{N}(\text{i})\text{-N}(\text{i}+1)}$, $^3J_{\text{C}\beta(\text{i})\text{-N}(\text{i}+1)}$. Ponieważ nie są to stałe homojądrowe $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$, więc nie są zbyt często wykorzystywane w badaniach strukturalnych biomolekuł.

Kąty torsyjne χ_i decydują o konformacji łańcuchów bocznych reszt aminokwasowych. W większości przypadków mamy do czynienia z resztami aminokwasowymi posiadającymi dwa protony H_β , co pozwala wyznaczyć dwie wicynalne stałe sprzężenia określające kąt torsyjny φ_1 . Wyjątkami są walina z dwoma geminalnymi grupami metylowymi na atomie C_β oraz izoleucyna i treonina z chiralnymi atomami C_β . Wicynalne stałe sprzężenia używane do wyznaczania

kąta torsyjnego φ_1 wykorzystujące sprzężenia z protonem H_β to $^3J_{\text{N-H}\beta}$, $^3J_{\text{C}'\text{-H}\beta}$, $^3J_{\text{H}\alpha\text{-H}\beta}$.

1.2.3. Oddziaływanie dipolowe i jądrowy efekt Overhausera

Energia oddziaływania dwóch dipoli o momentach magnetycznych μ_1 i μ_2 znajdujących się w odległości r jest proporcjonalna do r^{-3} . Hamiltonian tego oddziaływania zależy od tensora oddziaływania dipolowego. W układzie współrzędnych, w którym oś z pokrywa się z wektorem r jest to tensor diagonalny, którego elementy są proporcjonalne do r^{-3} .

W cieczach izotropowa reorientacja cząsteczki powoduje uśrednianie sprzężenia dipolowego do zera i dlatego w widmie nie obserwuje się rozszczepienia sygnałów spowodowanego oddziaływaniem dipolowym. Jego obecność można jednak obserwować pośrednio przez jądrowy efekt Overhausera (*ang. Nuclear Overhauser Effect, NOE*). NOE jest to zmiana intensywności sygnału NMR spinów A spowodowana zakłóceniem równowagi termodynamicznej spinów X oddziałujących dipolowo ze spinami A. Wielkość tego oddziaływania określa współczynnik wzmocnienia NOE - η [17]:

$$\eta_A(X) = \frac{\Delta I}{I_0} \quad \text{Równanie 18}$$

gdzie:

ΔI - zmiana intensywności sygnału NMR spinów A spowodowana zakłóceniem równowagi spinów X

I_0 - intensywność sygnału spinów A w układzie niezaburzonym

Współczynnik wzmocnienia η jest bardzo użytecznym parametrem w badaniach strukturalnych biomolekuł, ponieważ jego wielkość jest związana z odległością międzyjądrową r zależnością:

$$\eta \sim \frac{f(\tau_c)}{r^6} \quad \text{Równanie 19}$$

gdzie:

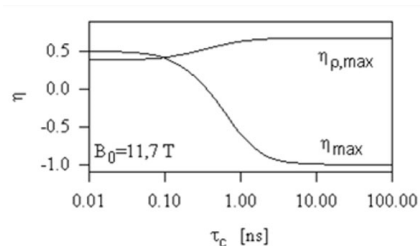
$f(\tau_c)$ - funkcja czasu korelacji τ_c [18].

Czas korelacji τ_c jest w dużym uproszczeniu parametrem opisującym szybkość reorientacji całej cząsteczki w roztworze (sztywna cząsteczka podlegająca reorientacji izotropowej w czasie τ_c zmienia orientację o 1 radian).

Jądrowy efekt Overhausera można obserwować także w wirującym układzie współrzędnych (ROE, *ang. Rotating frame NOE*). W warunkach rezonansu efektywne pole $B_{\text{eff}} \approx B_1$ znajduje się w płaszczyźnie $x'y'$ a podczas jego działania składowe $M_{x'y'}$ magnetyzacji związane są z B_1 . Technika ta nazywana jest ujarzmianiem spinów (*ang. Spin Locking, SL*). Pole B_1 jest o kilka rzędów wielkości mniejsze od pola B_0 , zatem w wirującym układzie współrzędnych ujarzmiona magnetyzacja maleje do wartości równowagowej (B_0/B_1) razy mniejszej niż przed rozpoczęciem sekwencji. Mechanizm tej relaksacji jest analogiczny jak w przypadku relaksacji poprzecznej.

Na Ryc. 6 porównano wartości współczynników wzmocnienia NOE i ROE w zależności od czasów korelacji τ_c . W laboratoryjnym układzie współrzędnych dla czasu korelacji $\tau_c \approx 1.12/\omega_A$ współczynnik η przechodzi przez zero. W tym obszarze w laboratoryjnym układzie współrzędnych pośrednia obserwacja oddziaływań dipolowych nie jest możliwa. Natomiast w wirującym układzie efekt Overhausera

sera jest zawsze dodatni. W dużym uproszczeniu można powiedzieć, że dla molekuł o średniej wielkości, charakteryzujących się czasami korelacji znajdującymi się w obszarze 0.2 - 2.0 ns, gdy najczęściej $\omega_A \tau_c \approx 1.12$, efekty NOE są bardzo słabe lub ich się nie obserwuje [19,20]

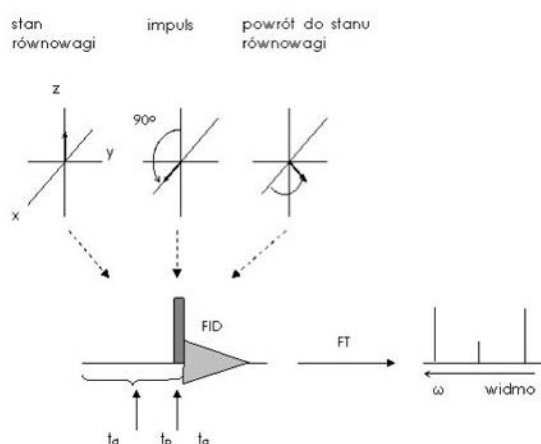


Ryc. 6. Zależność czasu korelacji od współczynnika wzmocnienia w układzie laboratoryjnym i wirującym.

1.3. Jednowymiarowa spektroskopia NMR

Po zaabsorbowaniu promieniowania przez zbiór spinów jądrowych wektor magnetyzacji jest wychylony ze stanu równowagi - pojawiają się jego składowe M_y i M_x . Po zakończeniu impulsu wektor magnetyzacji wykonuje precesję w polu zewnętrznym B_0 , a składowe poprzeczne magnetyzacji (M_x , M_y) indukują w cewce detektora napięcie (sygnał precesji swobodnej, ang. *Free Induction Decay*, FID) [8]. Napięcie jest próbkowane w równoodległych odstępach czasu. Dzięki procesom relaksacyjnym układ jąder powraca do stanu równowagi. Składowa poprzeczna magnetyzacji zmniejsza się, co powoduje zmniejszanie się amplitudy sygnału na wejściu detektora (FID) (Ryc. 7). Wyniki eksperymentu analizuje się w postaci widm czyli absorpcji w funkcji częstości, które otrzymuje się po transformacji Fouriera (FT) sygnału FID, będącego interferogramem w dziedzinie czasu [11].

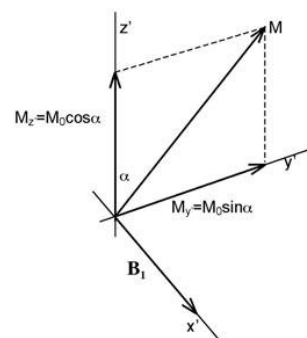
Najprostszy pomiar widma NMR, eksperyment jednowymiarowy, można podzielić na następujące etapy: przygotowanie t_d kończące się wytworzeniem nierównowagowego stanu poprzez działanie impulsu w czasie t_p oraz detekcja w czasie t_a .



Ryc. 7. Schemat podstawowego eksperymentu jednowymiarowego. Wynik działania impulsu 90° ; reprezentacja wektorowa i zapis graficzny.

W warunkach rezonansu impuls o kierunku pola B_1 wzdłuż osi x' działający w czasie t_p powoduje precesję magnetyzacji w płaszczyźnie $y'z'$. W czasie t_p wektor M

zaczyna kąt $\alpha = \omega_1 t_p$ (Ryc. 8). Impulsom przypisuje się kąt, na jaki pod ich działaniem wychylana jest magnetyzacja. Dodatkowymi parametrami określającymi impuls jest jego faza φ (kąt na płaszczyźnie $x'y'$, jaki tworzy pole B_1 z kierunkiem osi x') oraz kąt θ (odchylenie pola wytwarzanego przez impuls od płaszczyzny $x'y'$).



Ryc. 8. Wektor magnetyzacji M w wirującym układzie współrzędnych po włączeniu impulsu pola B_1 skierowanego wzdłuż x' ($\varphi=0$).

Maksymalna wartość składowej poprzecznej magnetyzacji powstaje po działaniu impulsu $\alpha=90^\circ$. Powszechnie taki impuls nazywa się krótko impulsem 90° lub $\pi/2$. Odwrócenie wektora magnetyzacji, uzyskuje się działając impulsem 180° (π).

W celu poprawy jakości rejestracji widm NMR opiera się na wielokrotnym powtarzaniu sekwencji pomiarowej i spójnym dodawaniu sygnału FID. W takiej sytuacji stosunek sygnału do szumu, $S/N \sim n^{1/2}$, gdzie n - liczba spójnych powtórzeń. Parametrem wpływającym na jakość widma jest również rozdzielczość cyfrowa określona przez liczbę punktów pomiarowych w przedziale widmowym. W idealnym przypadku można by wydłużyć czas rejestracji poprawiając rozdzielczość cyfrową w sposób nieograniczony. Realnie nie jest to możliwe, gdyż należy uwzględnić szybkość zaniku sygnału precesji swobodnej FID (R_2^*), zależną od szybkości relaksacji poprzecznej R_2 oraz niejednorodności pola B_0 :

$$R_2^* = R_2 + \frac{\gamma \Delta B_0}{2} \quad \text{Równanie 20}$$

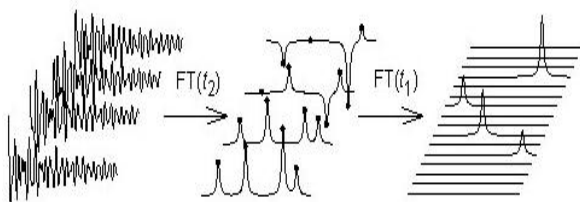
Przy $t_a > 5/R_2^*$ zazwyczaj następuje znaczne zmniejszanie stosunku S/N .

1.4. Wielowymiarowa spektroskopia NMR

Punktem wyjścia do wyznaczenia struktury układów chemicznych jest identyfikacja i analiza obserwowanych sygnałów NMR. W przypadku białek i peptydów nakładanie się sygnałów w widmie jednowymiarowym utrudnia lub uniemożliwia to zadanie. Trudność tę można przezwyciężyć wykonując widma wielowymiarowe. Poniżej zostanie przedstawiona idea uzyskiwania widm dwuwymiarowych; rejestracja widm o liczbie wymiarów większej niż dwa odbywa się w analogiczny sposób.

Dwuwymiarowe widma NMR otrzymuje się przez rejestrację serii widm jednowymiarowych w odpowiednio zaprojektowanych sekwencjach. Poszczególne widma jednowymiarowe różnią się inkrementowanym czasem t_1 wprowadzonym po okresie przygotowania. Powoduje to oscylacje intensywności i faz sygnałów poszczególnych jąder. Widmo takie zawiera informacje o częstościach jąder od-

działających ze sobą. Po transformacji Fouriera względem obu czasów t_1 i t_2 dostaje się widmo dwuwymiarowe [21] (Ryc. 9).



Ryc. 9. Schemat powstawania widma dwuwymiarowego [10].

Eksperyment dwuwymiarowy składa się z czterech etapów: przygotowania, które kończy się wytworzeniem stanu nierównowagowego (t_d) - analogiczne jak w eksperymencie jednowymiarowym, inkrementowanego czasu t_1 , podczas którego układ spinów ewoluuje, czasu mieszania t_m , w którym następuje korelacja spinów oraz detekcji w czasie t_2 [22].

1.4.1. Wybrane techniki wielowymiarowe

Do wyznaczania struktury przestrzennej układów biologicznych wykorzystuje się zarówno widma korelujące sygnały spinów jądrowych oddziałujących skalarnie jak i widma, w których do korelacji wykorzystuje się oddziaływanie dipolowe. Zastosowanie odpowiedniej sekwencji impulsów pozwala na zarejestrowanie w widmie tylko jednego typu korelacji.

Homojądrowe ^1H - ^1H widma TOCSY (ang. *Total Correlation Spectroscopy*) [23,24,25], wykorzystujące korelacje przez sprzężenia skalarnie stosowane są do identyfikacji układów spinowych. Aby umożliwić efektywne przeniesienie oddziaływania na jądra atomów oddalonych od siebie o kilka wiązań walencyjnych stosuje się sekwencje ujarzmiające. Taka sekwencja wiąże magnetyzację w płaszczyźnie $x'y'$ z polem B_{ef} i trwa w czasie mieszania t_m . W przypadku białek i peptydów protony każdej reszty aminokwasowej, poza metioniną oraz resztami aminokwasowymi zawierającymi układy aromatyczne, stanowią jeden, izolowany układ spinowy. Na Ryc. 10 zaprezentowano układy spinowe tryptofanu.

W eksperymentach wykorzystujących sprzężenie skalarnie nie obserwuje się sygnałów korelujących oddziaływanie dipolowe. Takie korelacje można uzyskać stosując eksperyment NOESY (ang. *Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*) [26] lub jego wariant w wirującym

układzie współrzędnych - ROESY (ang. *Rotating frame Overhauser Enhancement Spectroscopy*) [20,23,24].

Odległości międzyprotonowe uzyskane z analizy intensywności sygnałów w widmach NOESY/ROESY są kluczowym parametrem wykorzystywanym do wyznaczenia struktury biomolekuł. Jak pokazano wcześniej (równanie 19) współczynnik wzmocnienia NOE, jak również intensywność sygnału korelacyjnego, są odwrotnie proporcjonalne do szóstej potęgi odległości między oddziałującymi protonami. Przy założeniu stałej wartości funkcji $f(\tau_c) = \text{const}$ oraz dysponując znaną odległością międzyprotonową (na przykład odległością między protonami geminalnymi w łańcuchu alifatycznym czy między protonami w pierścieniu aromatycznym) można skalibrować uzyskane z widma NOESY/ROESY intensywności sygnałów.

$$r_i = r_{\text{ref}} \left(\frac{I_{\text{ref}}}{I_i} \right)^{1/6}$$

Równanie 21

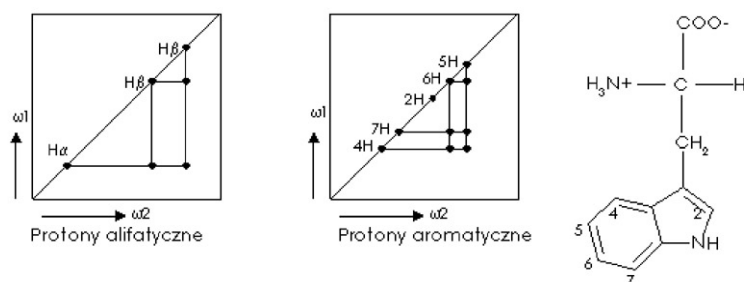
gdzie:

I_i - intensywność sygnału korelacyjnego między dwoma protonami oddziałującymi dipolowo znajdującymi się w odległości r_i

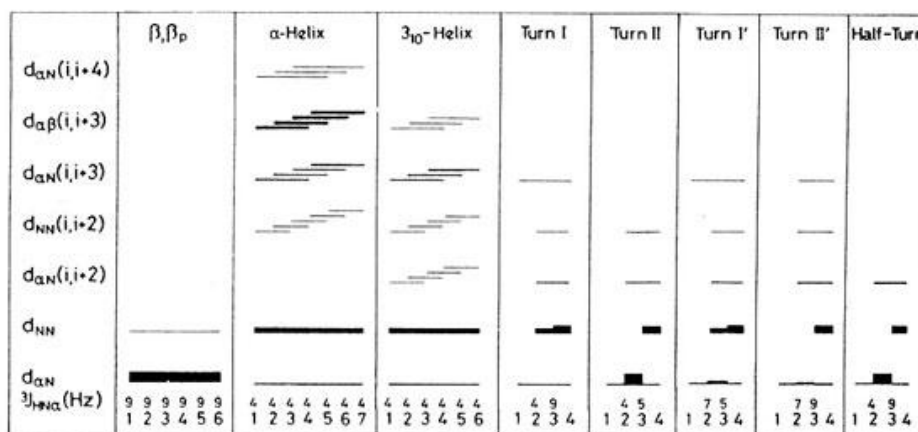
I_{ref} - intensywność sygnału korelacyjnego między dwoma protonami oddziałującymi dipolowo o znanej odległości r_{ref}

Postępowania prowadzące do pełnego przypisania sygnałów w przypadku białek i kwasów nukleinowych zostało szczegółowo opisane przez Wüthricha [18] i później przez innych autorów [12]. Na podstawie widma TOCSY można wyróżnić układy spinowe charakterystyczne dla różnych rodzajów reszt aminokwasowych. Nie daje to jednak informacji strukturalnych, nie jest też możliwe określenie pozycji reszty aminokwasowej w sekwencji. Informacje takie uzyskuje się z widm typu NOESY/ROESY.

Najważniejszym etapem analizy strukturalnej jest przypisanie sygnałów korelacyjnych odpowiednim jądom w sekwencji białka lub peptydu. Przypisania sekwencyjne ($i, i+1$) służące do oznaczenia kolejności sekwencji aminokwasów w białku wykonuje się w oparciu o sygnały korelacyjne $H_N(i)/H_N(i+1)$ oraz/lub $H_\alpha(i)/H_N(i+1)$. Sygnały sekwencyjne mają duże znaczenie w procesie identyfikacji przesunięć chemicznych poszczególnych protonów jednak, podobnie jak sygnały intrarezydualne (i, i), nie odgrywają dużego znaczenia w analizie dotyczącej struktury drugo- i trzeciorzędowej badanej biomolekuły.



Ryc. 10. Układy spinowe tryptofanu.



Ryc. 11. Kontakty NOE i stałe sprzężenia charakterystyczne dla wybranych elementów struktury [18].

Poszczególne elementy struktury drugorzędowej przejawiają się w widmie w postaci charakterystycznych zestawów sygnałów NOE oraz wartości stałych sprzężenia spinowego $^3J_{H\alpha-HN}$. Ryc. 11 prezentuje sygnały korelacyjne oraz wartości stałych sprzężenia spinowego typowe dla wybranych struktur drugorzędowych możliwe do zaobserwowania w widmie NOESY/ROESY. Szerokości linii obrazują względne intensywności sygnałów.

W przypadku małych biomolekuł, gdy mamy do czynienia z dobrze rozseparowanymi sygnałami, do analizy strukturalnej wystarczą dwuwymiarowe techniki homojądrowe 1H - 1H . Jednak kiedy obserwuje się znaczną degenerację sygnałów, konieczne jest wykorzystanie technik heterojądrowych połączonych z trój- lub nawet czterowymiarową spektroskopią NMR. Techniki hetero-jądrowe korelują przesunięcia chemiczne różnych izotopów. Najczęściej do wyznaczania struktury stosuje się techniki korelujące przesunięcia chemiczne heterojąder ^{13}C i/lub ^{15}N z jądrami 1H . Jednym z najpopularniejszych dwuwymiarowych eksperymentów heterojądrowych jest eksperyment HSQC (*ang. Heteronuclear Single Quantum Coherence*) [27,28,29,30] korelujący przesunięcia chemiczne heterojąder i bezpośrednio (jedno wiązanie walencyjne) z nimi związanych protonów. W sekwencji HSQC wykorzystuje się tzw. metodę detekcji odwrotnej (*ang. inverse detection*) gdzie zachodzi przeniesienie polaryzacji protonów na heterojądra. Heterojądra ewoluują w czasie t_1 , po czym magnetyzacja jest ponownie przenoszona do protonów i zostaje wykonana detekcja. Podczas detekcji protonowej heterojądra są nasycane sekwencją impulsów o częstotliwościach radiowych (odsprężanie) w celu zlikwidowania oddziaływań spinowych pomiędzy jądrami 1H i heterojądrami. Wynikiem tego działania jest zanik struktury multipletowej [31,32].

Dodatkowe możliwości stwarza zastosowanie technik gradientowych. Gradienty impulsowe (*ang. Pulsed Field Gradient, PFG*) stosuje się w celu chwilowego, kontrolowanego w czasie wywołania niejednorodności pola B_0 w określonej objętości próbki. Większość stosowanych gradientów impulsowych jest skierowanych wzdłuż pola B_0 . Zastosowanie technik gradientowych pozwala między innymi na zlikwidowanie sygnału od niepożądanego izotopomeru (1H - ^{12}C , 1H - ^{14}N). Jest to szczególnie ważne przy rejestracji

widm korelacyjnych dla związków o naturalnej zawartości izotopów o spinie $\frac{1}{2}$ [33,34,35,36,37].

2. Metody obliczeniowe

Określenie struktury przestrzennej białka lub peptydu na podstawie danych doświadczalnych polega na znalezieniu konformacji o najniższej energii spośród wszystkich spełniających ograniczenia eksperymentalne. W przypadku badań biomolekuł metodami magnetycznego rezonansu jądrowego najczęściej wykorzystywanymi więzami są odległości międzyprotonowe oraz kąty torsyjne uzyskiwane odpowiednio z analizy intensywności sygnałów NOE oraz skalarnych stałych sprzężenia. W dalszej części przedstawiono kilka najpopularniejszych metod obliczeniowych wykorzystujących więzy NMR.

2.1. Geometria odległościowa

Geometria odległościowa (*ang. Distance Geometry, DG*) [38,39] jest najbardziej ogólną metodą obliczania struktury cząsteczki bądź jej fragmentu w przestrzeni odległości międzyatomowych a następnie przeniesienie takiego rozwiązania do przestrzeni współrzędnych kartezjańskich. Podejście to opiera się na możliwości przedstawienia międzyatomowych kontaktów NOE uzyskanych z eksperymentów NMR i większości danych stereochemicznych w postaci macierzy definiującej odległości międzyatomowe [40].

Struktury otrzymane za pomocą tej metody zazwyczaj charakteryzują się wysoką energią z powodu dużej liczby naprężeń sterycznych czy też oddziaływań niewiązanych. Dlatego stosowane obecnie programy służące do wyznaczania struktury biomolekuł z danych doświadczalnych ograniczają zastosowanie algorytmu geometrii odległości do otrzymania struktury startowej służącej jako punkt wyjścia dla innych algorytmów obliczeniowych.

2.2. Metoda symulowanego wyżarzania w dynamice molekularnej

Metodą powszechnie stosowaną w obliczeniach struktury biomolekuł na podstawie danych pochodzących ze spektroskopii NMR jest numeryczne rozwiązywanie równań ruchu Newtona [41] zwane dynamiką molekularną. Dla

układu N cząstek o masach m_i ($i=1, \dots, N$) i współrzędnych r_i równania ruchu dane są wyrażeniem:

$$m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} = F_i \quad \text{Równanie 22}$$

gdzie:

$$F_i = -\nabla E_{\text{pot}}$$

$$\text{oraz: } \nabla = \left(\frac{\partial}{\partial x}, \frac{\partial}{\partial y}, \frac{\partial}{\partial z} \right) \quad \text{Równanie 23}$$

Założeniem tej metody jest przeszukiwanie przestrzeni konformacyjnej cząsteczki i znalezienie struktur spełniających więzy eksperymentalne, czyli minimalizacja energii potencjalnej systemu. Aby zapobiec wpadnięciu cząsteczki do lokalnego minimum i umożliwić w miarę szerokie przeszukiwanie przestrzeni konformacyjnej, symulacje przeprowadza się szybko podgrzewając układ do bardzo wysokiej temperatury (rzędu kilku tysięcy K), pozostawiając go na pewien czas w tej temperaturze (równowagowanie) a następnie powoli schładzając (symulowane wyżarzanie, *ang. Simulated Annealing, SA*), co umożliwia pokonywanie barier energetycznych [42,43,44].

Całkowita energia potencjalna jest reprezentowana przez sumę energii oddziaływań kowalencyjnych (E_{cv}), energię oddziaływań niewiązujących (E_{nb}) oraz członów reprezentujących dane eksperymentalne (E_{NMR}):

$$E_{\text{pot}} = E_{\text{cv}} + E_{\text{nb}} + E_{\text{NMR}} \quad \text{Równanie 24}$$

Człon E_{NMR} zawiera pochodzące z analizy widm NOESY informacje dotyczące odległości międzyatomowych, E_{NOE} , oraz wartości kątów torsyjnych (z analizy stałych sprzężenia), E_{TOR} :

$$E_{\text{NMR}} = E_{\text{NOE}} + E_{\text{TOR}} \quad \text{Równanie 25}$$

Ponieważ nie zawsze istnieje możliwość uzyskania stałych sprzężenia spinowego, więc wyrażenie E_{TOR} może, lecz nie musi, być obecne w powyższym równaniu.

Protokół symulowanego wyżarzania prowadzi do uzyskania zbioru konformacji spełniających więzy eksperymentalne. Jednym z podstawowych kryteriów umożliwiającym porównanie struktur przestrzennych jest wartość średniego odchylenia standardowego (*ang. Root Mean Square Deviation, RMSD*) zdefiniowana w następujący sposób:

$$\text{RMSD}(A, B) = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \|\vec{r}_i^A - \vec{r}_i^B\|^2} \quad \text{Równanie 26}$$

gdzie:

\vec{r}_i^A, \vec{r}_i^B - to współrzędne kartezjańskie i-tego atomu należącego do struktury A i B (odpowiednio)

$$\|\vec{a}\| - \text{oznacza normę; } \|\vec{a}\| = \|\vec{a}_1, \vec{a}_2, \dots, \vec{a}_j\| = \sqrt{\sum_{i=1}^j a_i^2}$$

n - liczbę atomów stanowiących kryterium porównawcze w każdej strukturze.

Najczęściej podawana jest wartość RMSD obliczona dla atomów łańcucha głównego (C_α, C', N) kolejnych reszt aminokwasowych. Jest to dobre kryterium porównania struktury drugorzędowej i sfaldowania białka. Wartość średniego odchylenia standardowego między otrzymanymi strukturami zależy od liczby i dokładności określenia jednoznacznych więzów eksperymentalnych.

2.3. Dynamika w przestrzeni kątów torsyjnych

Dynamika w przestrzeni kątów torsyjnych (*ang. Torsion Angle Dynamics, TAD*) pozwala na zmniejszenie liczby stopni swobody przez zastąpienie współrzędnych kartezjańskich odpowiednimi wartościami kątów torsyjnych (przyjmuje się, że długości wiązań i kąty płaskie są stałe) oraz równań ruchu Newtona równaniami Lagrange'a [45,46,47,48,49,50,51,52,53,54].

$$\frac{d}{dt} \left(\frac{\partial L}{\partial \dot{\theta}_k} \right) - \frac{\partial L}{\partial \theta_k} = 0 \quad \text{Równanie 27}$$

gdzie:

$L = E_{\text{kin}} - E_{\text{pot}}$ - funkcja Lagrange'a

θ - odpowiedni kąt torsyjny

$k=1, \dots, n$

Energia potencjalna wyraża się zależnością:

$$E_{\text{pot}} = \omega_0 V \quad \text{Równanie 28}$$

gdzie:

V - funkcja celu; $V \geq 0$

ω_0 - współczynnik wagi; $\omega_0 = 10 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$

Dynamika w przestrzeni kątów torsyjnych najczęściej jest wspomagana metodą symulowanego wyżarzania, podobnie jak dynamika w przestrzeni kartezjańskiej.

2.4. Metoda wyznaczania wag statystycznych konformacji

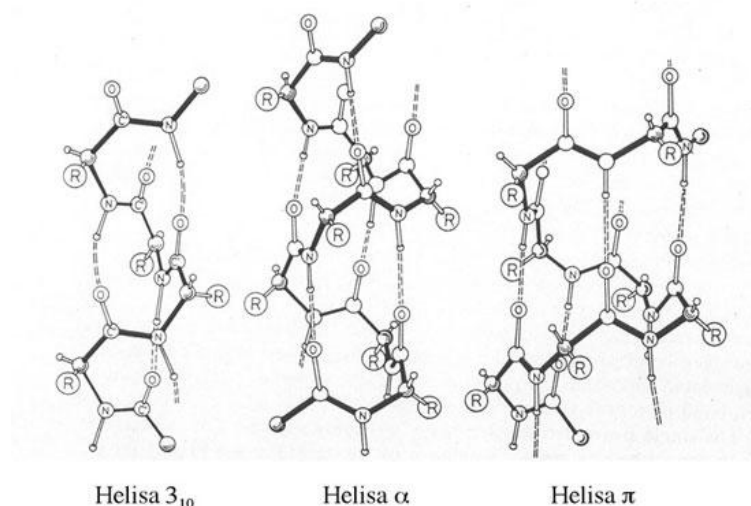
W odróżnieniu od większości białek peptydy charakteryzują się dużą labilnością konformacyjną. Dlatego w tym przypadku metody prowadzące do wyznaczenia jednej konformacji nie sprawdzają się. Dotychczas podjęto jedynie nieliczne próby uwzględnienia labilności konformacyjnej peptydów w obliczeniach struktury. Metodą rokującą największe nadzieje jest opracowana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego oraz w Cornell University metoda wyznaczania średniej struktury peptydów oparta na obliczaniu wag statystycznych najbardziej prawdopodobnych konformerów obecnych w roztworze [55]. W metodzie tej zakłada się występowanie w widmie NMR uśrednionych kontaktów NOE i stałych sprzężeń pochodzących od różnych konformerów, a wagi statystyczne poszczególnych udziałów zależą od procentowego występowania danej konformacji w roztworze.

Decyzja o zastosowaniu konkretnej metody obliczeniowej jest w dużej mierze arbitralna. Metody dynamiki molekularnej sprawdzają się w przypadku wyznaczania struktury takich obiektów, które w roztworze przyjmują jedną konformację, na przykład białek. W przypadku labilnych peptydów problem komplikuje się przez fakt, że posiadające dużą swobodę konformacyjną peptydy mogą w roztworze występować w wielu konformacjach o różnych udziałach. W takich przypadkach doskonale sprawdza się metoda wyznaczania wag statystycznych konformacji.

3. Przykład zastosowania technik NMR do badań strukturalnych układów helikalnych [56]

3.1. Model propagacji helisy

Helisy (Ryc. 12) są jednym z częściej występujących elementów struktury drugorzędowej w białkach, ocenia się, że ponad 30% aminokwasów przyjmuje konformację charakterystyczną dla konformacji helikalnej [57,58].



Ryc. 12. Helisy 3_{10} , α oraz π . Linie przerywane oznaczają wiązania wodorowe stabilizujące układy helikalne [59].

Tabela 1. Typowe wartości kątów torsyjnych Φ i Ψ oraz zasięg wiązań wodorowych charakterystycznych dla poszczególnych typów helisy.

	Helisa 3_{10}	Helisa α	Helisa π
Kąt Φ	-49.0	-57.8	-57.1
Kąt Ψ	-26.0	-47.0	+69.7
wiązanie wodorowe CO--HN	i,i+3	i,i+4	i,i+5

Badania nad zagadnieniem powstawania i elongacji helis są prowadzone od lat [60,61,62,63,64,65,66,67,68,69]. Powstał model propagacji układów helikalnych sformułowany w następujący sposób:

- Powstanie pierwszego skrętu helisy wymaga dużego wkładu entropowego ze względu na konieczność jednoczesnego usztywnienia 6 kątów torsyjnych.
- Każdy następny skręt helisy powstaje przez usztywnienie tylko dwóch kątów a zatem koszt energetyczny jest znacznie mniejszy. Wynika z tego, że preferowane powinny być długie odcinki helikalne.
- Wkład entropowy jest rekompensowany przez wkład entalpowy, przede wszystkim utworzenie wiązań wodorowych.
- Łańcuch boczny reszty aminokwasowej może stabilizować bądź destabilizować helisę przez oddziaływanie z łańcuchem głównym oraz z łańcuchami bocznymi innych reszt.

Stała równowagi między formą helikalną (H_n) a niehelikalną (A) odcinka homopolipeptydu o liczbie reszt aminokwasowych (n) w tym modelu wyraża się zależnością:

$$K = \frac{[H_n]}{[A]} = \sigma \cdot s^{n-2} \quad \text{Równanie 29}$$

gdzie:

- σ - zdolność danej reszty do inicjowania helisy (czynnik nukleacji)
- s - stała równowagi konformacyjnej (helisa \leftrightarrow konformacja rozwinięta) charakterystyczna dla danej reszty aminokwasowej

Wartość czynnika nukleacji jest rzędu 10^{-3} , natomiast stała równowagi s przyjmuje wartości od 0.001 dla prolina do 1.54 dla alaniny w temperaturze 1°C , ekstrapolacja do 25°C daje wartość 1.3 [69]. Stała równowagi s świadczy o skłonności danego aminokwasu do przyjmowania konforma-

cji helikalnej. Prolina i glicyna charakteryzują się najmniejszymi wartościami stałej s , czyli są najmniej podatne na występowanie w konformacji helikalnej, a największą skłonność do przyjmowania konformacji helikalnej wykazuje alanina.

3.2. Badanie szybkości wymiany chemicznej

Dogodną metodą oceny wielu parametrów konformacyjnych jest badanie szybkości wymiany chemicznej. Protony, czyli jądra atomów wodoru grup funkcyjnych występujących w białkach i peptydach takich jak grupy aminowe $-\text{NH}_2$, amidowe $-\text{C}(\text{O})\text{NH}$, tiolowe $-\text{SH}$ czy hydroksylowe $-\text{OH}$ mogą wymieniać się z protonami cząsteczek wody, stanowiącej rozpuszczalnik, bądź między sobą. Ta ostatnia możliwość jest znacznie mniej prawdopodobna ze względu na ogromny nadmiar cząsteczek wody w stosunku do cząsteczek białka (przeciętnie stężenie białka w próbkach stosowanych do badań NMR wynosi kilka mM/l wobec stężenia wody $\sim 55\text{M/l}$). Protony zaangażowane w wiązania wodorowe bądź takie, które nie są eksponowane do roztworu charakteryzują się mniejszą wartością stałej szybkości wymiany chemicznej niż pozostałe labilne protony cząsteczki [70]. Szczególnie pomocne jest określenie zachowania się protonów amidowych, gdyż protony tych grup biorą udział w wiązaniach wodorowych stabilizujących strukturę drugorzędową. Stała szybkości wymiany chemicznej protonu amidowego konkretnego aminokwasu zależy od wielu czynników zewnętrznych takich jak pH, temperatura, oddziaływanie sąsiednich reszt aminokwasowych, czy miejsce w sekwencji.

Obliczone oczekiwane stałe szybkości wymiany chemicznej zależą od warunków zewnętrznych, w jakich znalazła się cząsteczka peptydu (pH, temperatura) oraz od jej sekwencji. Nie wnoszą natomiast informacji strukturalnych. Dopiero analiza stosunku takiej obliczonej oczekiwa-

nej wartości do faktycznej zmierzonej prędkości wymiany daje możliwość wyciągania wniosków na temat struktury przestrzennej peptydów lub białek. Sposób eksperymentalnego wyznaczania stałych szybkości wymiany chemicznej protonów amidowych opisano dalej. Stosunek tych dwóch wielkości nosi nazwę współczynnika protekcji p :

$$p = \frac{k_{\text{teor}}}{k_{\text{exp}}} \quad \text{Równanie 30}$$

Protony zaangażowane w wiązania wodorowe bądź osłanianie przed kontaktem z rozpuszczalnikiem charakteryzują się współczynnikiem protekcji większym od jedności.

3.2.1. Badanie szybkości wymiany za pomocą spektroskopii NMR

Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego jest dogodną metodą umożliwiającą pomiar szybkości wymiany protonów amidowych z protonami rozpuszczalnika. Najczęściej stosuje się w tym celu technikę przeniesienia magnetyzacji [71]. Technikę tę stosuje się w przypadku, gdy magnetyzacja przenoszona jest między dwoma nierównoważnymi stanami A i B o różnych przesunięciach chemicznych a zakłócenie magnetyzacji jednego ze stanów może być wykrywane w drugim. Stosowalność tej metody zależy od szybkości wymiany badanych protonów; najczęściej jest ona efektywna w przedziale $[0.05\text{s}^{-1}, 20\text{s}^{-1}]$. Ponadto dokładność metody jest limitowana stosunkiem szybkości wymiany (k) do szybkości relaksacji (ρ) i jest najbardziej efektywna przy spełnionym warunku $k/\rho > 0.1$ [72].

Rozważmy układ, w którym proton może występować w stanie A lub B:



W takim układzie średni czas życia w stanie A (τ_A) lub B (τ_B) definiuje się następująco: $\tau_A = 1/k_{+1}$; $\tau_B = 1/k_{-1}$.

W eksperymencie NMR magnetyzacja spinu w jednym ze stanów jest zaburzona przez selektywne nasycanie (*ang. Saturation Transfer*) bądź odwrócenie (*ang. Inversion Transfer*) za pomocą odpowiedniej sekwencji impulsów. Monitoruje się następnie magnetyzację spinu w drugim stanie, bądź w obu jednocześnie, w zależności od czasu trwania zaburzenia lub od czasu upływającego między impulsem zaburzającym a sekwencją pomiarową.

Aby otrzymać stałą szybkości k_{+1} reakcji przedstawionej w równaniu 31 za pomocą metody przeniesienia nasycenia [71,73] stosuje się impuls nasycający działający selektywnie na spiny znajdujące się w stanie A, następnie obserwowana jest zmiana intensywności sygnału B w czasie t po usunięciu pola nasycającego działającego na jądro w stanie A.

Druga ze wspomnianych metod [74,75] polega na selektywnym napromieniowaniu spinów znajdujących się w jednym ze stanów impulsem 180° , co powoduje odwrócenie ich magnetyzacji. Magnetyzacja napromieniowanego spinu, na skutek zachodzących procesów relaksacji, powraca do wartości równowagowej, podczas gdy intensywność spinu znajdującego się w drugim stanie zmienia się na skutek procesu wymiany. Metoda ta umożliwia badanie wymiany chemicznej układów bardziej skomplikowanych, niż dwustanowe [76].

Przez porównanie eksperymentalnych szybkości wymiany protonów amidowych z oczekiwanymi wartościami obliczonymi otrzymuje się współczynnik protekcji $p = k_{\text{teor}}/k_{\text{exp}}$ (równanie 30) pozwalający ocenić zaangażowanie badanej reszty aminokwasowej w konformację helikalną.

3.3. Układ modelowy

Poznanie mechanizmów tworzenia i wzrostu helisy jest bardzo istotnym problemem przy rozważaniu wczesnych etapów związania białka. Dotychczas stosowane metody badawcze takie jak spektroskopia fluorescencyjna, dichroizm kołowy, badania kalorymetryczne nie dostarczały wystarczających danych do opisu tego zjawiska. Zastosowanie magnetycznego rezonansu jądrowego do badania modelowych peptydów prowadzi do uzyskania dodatkowych informacji i pozwala na opisanie zjawiska inicjacji i pierwszych etapów wzrostu helisy.

Z równania 29 wynika, że struktury helikalne powinny być dobrze stabilizowane tylko dla długich odcinków (duża wartość n), złożonych z reszt aminokwasowych o właściwościach prohelikalnych (duże wartości s) takich jak alanina czy arginina. Jednak większość helis w białkach jest krótka - tworzy je kilka lub kilkanaście reszt i to nie zawsze przejawiających właściwości prohelikalne [57]. Ponadto nie jest jasne, czy krótka helisa jest helisą α , helisą β czy helisą π . Dotychczas mimo wielu przeprowadzonych rozważań teoretycznych [60,77,78] nie zajmowano się problemem występowania krótkich helis równie intensywnie od strony eksperymentalnej. Barięą był brak odpowiedniego układu modelowego badającego krótkie odcinki helikalne. Zastosowanie peptydów zawierających pętlę wapniową otwiera możliwości konfrontacji teorii z doświadczeniem. Cecha wspólną wspomnianych białek jest występowanie elementu struktury superdrugorzędowej - motywu dłoni EF, składającego się z dwóch helis połączonych pętlą wiążącą jon. Koordynacja jonu wymusza sztywną strukturę pętli, w której kąty torsyjne Φ i Ψ trzech ostatnich reszt mają wartości charakterystyczne dla konformacji helikalnej. Motywy EF białek wiążących jony wapnia są więc naturalnym miejscem nukleacji helisy i mogą służyć jako punkt wyjścia do projektowania układów modelowych służących do badania sposobów powstawania i wzrostu helisy.

Do badań modelowych zostały wybrane dwie serie peptydów będących analogami trzeciej pętli wiążącej jony wapnia w kalmodulinie szczura wysyczone jonami lantanu La^{3+} . Sposób wiązania jonów lantanu i wapnia jest analogiczny, a ponadto większy ładunek dodatni lantanowców zwiększa stałą wiązania nawet o dwa rzędy wielkości [79,80]. Jony lantanowców Ln^{3+} są szeroko stosowane jako sondy luminescencyjne i paramagnetyczne w badaniach białek wiążących jony wapnia i ich fragmentów [81,82]. Właściwości paramagnetyczne większości lantanowców powodują niekorzystne efekty w widmach NMR przez silne poszerzenie sygnałów na skutek skrócenia czasu T_2 . Jednak lantan jest jedynym diamagnetycznym lantanowcem, wskutek czego nie powoduje poszerzenia sygnałów i nadaje się do stosowania w badaniach białek metodą NMR. Ze względu na krótkość odcinka helikalnego oraz wysoką niemal 100% zawartość helisy, peptydy zawierające na swym końcu N sekwencję pętli wapniowej są idealnymi modelami do badania metodami NMR struktury oraz dynamiki kon-

formacyjnej helisy i oddziaływań stabilizujących tę konformację, takich jak hydratacja lub oddziaływania pomiędzy grupami bocznymi reszt aminokwasowych [83,84,85]. W badanych peptydach odcinek helikalny powstający na końcu C pętli po koordynacji jonu metalu jest stopniowo wydłużany przez dodawanie alaniny, aminokwasu znanego z właściwości prohelikalnych: seria I, PA_n , AcDKDGDGY- $IS^{15N}A^{15N}A E(^{15N}A_n)NH_2$ ($n=0-4$) oraz seria II, LA_n , AcDQDGDGYISAAE(A_n)hS ($n=0,2,4$).

3.4. Określanie struktury trzeciorzędowej peptydów

Wykonano pomiary NMR prowadzące do określenia struktury przestrzennej peptydów w formie *holo* (wysyczonej jonem lantanu) [56,86,87]. Widma wykonane dla peptydów w formie *apo* charakteryzują się silną degeneracją sygnałów i nie pozwalają na jednoznaczne przypisanie wszystkich przesunięć chemicznych 1H (co uniemożliwia wyznaczenie struktur przestrzennych). W szczególności wykorzystanie faktu selektywnego znakowania peptydów serii I, PA_n , 15N i zastosowanie technik heterojądrowych (widma gHSQC{ $^1H/^{15N}$ }) oraz homojądrowych (TOCSY, ROESY) umożliwiło identyfikację protonów amidowych alanin badanych związków w formie *apo*. Było to niezbędne do prawidłowej analizy statycznej szybkości wymiany i współczynników protekcji peptydów serii I, PA_n , w formie nie wysyczonej jonem lantanu.

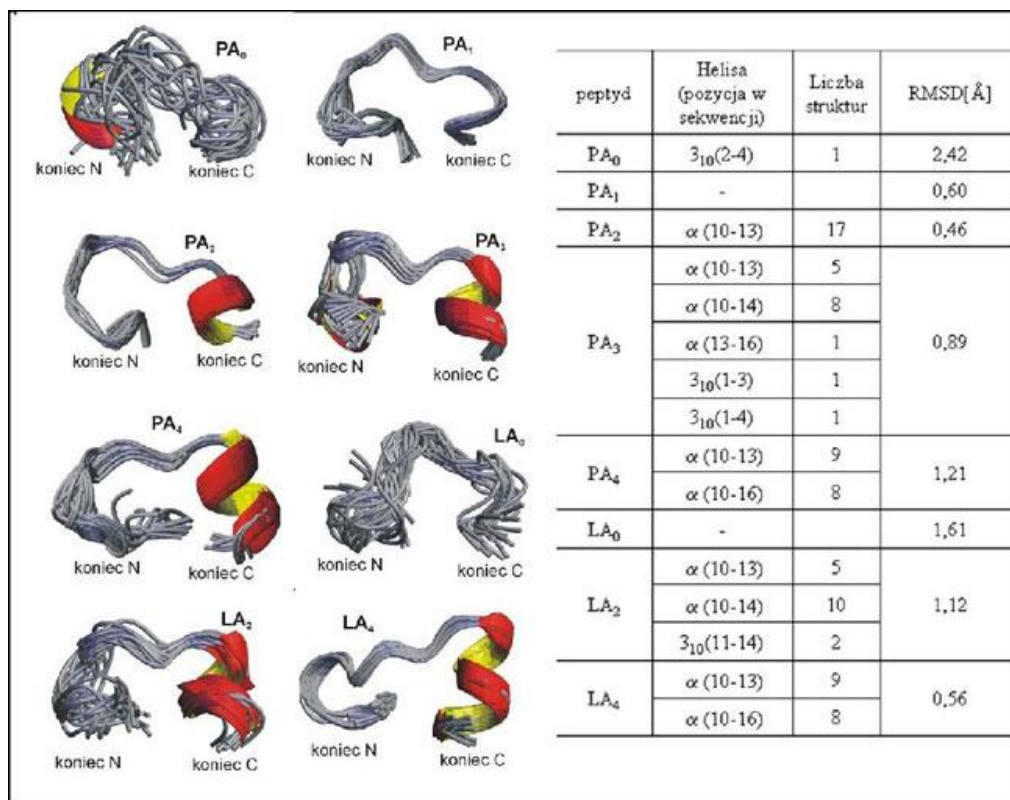
Do obliczeń struktury wykorzystano intensywności sygnałów pozadiagonalnych w widmach NOESY/ROESY. Wyznaczenie struktur przestrzennych peptydów przeprowadzono metodą dynamiki molekularnej z algorytmem symulowanego wyżarzania dostępnym w programie XPLOR [88].

Na Ryc. 13 pokazano 20 struktur o najniższej energii nałożonych po atomach łańcucha głównego całej cząsteczki.

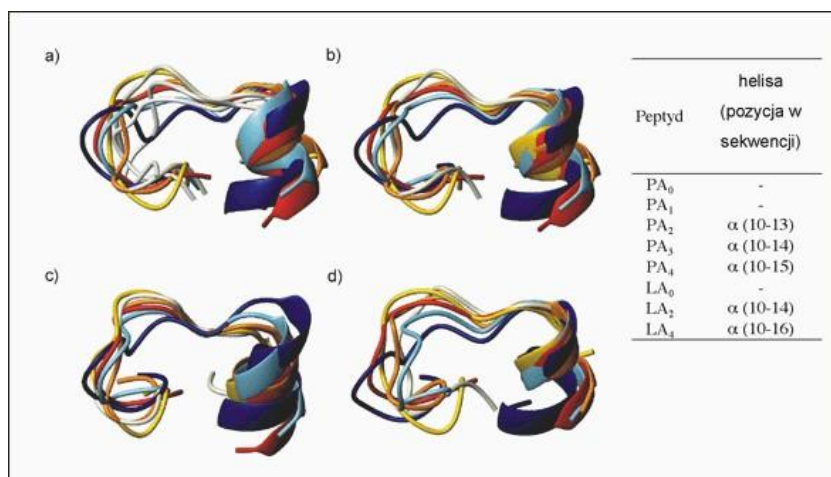
Obliczono struktury średnie dla każdego z peptydów, prezentowanych na Ryc. 13. Uśrednione struktury pokazane są na Ryc. 14, zaobserwowane fragmenty helikalne dla każdej z uśrednionych struktur podaje załączona Tabela. W peptydach PA_0 , PA_1 i LA_0 nie obserwuje się helisy. Obserwuje się wydłużanie odcinka helikalnego na końcu C w zależności od liczby alanin. W strukturach uśrednionych obserwuje się wyłącznie helisy α .

Przeprowadzono analizę statystyki wiązań wodorowych, w których uczestniczą protony amidowe reszt aminokwasowych znajdujących się na końcu C badanych peptydów w formie *holo* zaczynając od Ala10 z grupami karbonylowymi innych reszt aminokwasowych (Tabela 2). W peptydach obu serii obserwuje się wiązania wodorowe charakterystyczne zarówno dla helisy α (czerwony) jak i helisy 3_{10} (niebieski, kursywa).

Analiza wiązań wodorowych w badanych peptydach świadczy o występowaniu szybkiej równowagi konformacyjnej między helisą 3_{10} i helisą α . W skali czasów NMR obserwuje się uśredniony efekt w widmach. W krótkich peptydach ($n=0-2$) układ tych wiązań sugeruje dominację helisy 3_{10} . Wydłużanie peptydu poprzez dodawanie kolejnych alanin na końcu C powoduje przesunięcie równowagi konformacyjnej w stronę helisy α - tworzą się nowe wiązania wodorowe stabilizujące tę strukturę podczas gdy zmniejsza się populacja wiązań stabilizujących helisę 3_{10} . W najdłuższych peptydach obu serii helisa α jest najlepiej stabilizowana.



Ryc. 13. Struktury przestrzenne peptydów PA_n ($n=0-4$) oraz LA_n ($n=0,2,4$) nałożone po atomach łańcucha głównego. RMSD podane w załączonej Tabeli.

Ryc. 14. Należące uśrednione struktury peptydów serii I, PA_n:

- a) peptydy PA_n, n=0-4, nałożone po atomach łańcucha głównego reszt 1 - 12, RMSD=1.05Å;
 b) peptydy PA_n, n=1-4, nałożone po atomach łańcucha głównego reszt 1 - 13, RMSD=0.91Å;
 c) peptydy PA_n, n=1-4, nałożone po atomach łańcucha głównego reszt 1 - 9, RMSD=0.84Å;
 d) peptydy PA_n, gdzie n=1-4, nałożone po atomach łańcucha głównego reszt 9 - 13, RMSD=0.36Å.

Tabela 2. Statystyka wiązań wodorowych [%], w których zaangażowane są protony amidowe aminokwasów znajdujących się na końcu C peptydów w formie *holo*. Wartości dla helisy α podane są na czerwono, dla helisy 3₁₀ na niebiesko i kursywą.

HN	CO	PA ₀	PA ₁	PA ₂	PA ₃	PA ₄	HN	CO	LA ₀	LA ₂	LA ₄
Ala11	Ile8	7	-	-	-	-	Glu12	Ser9	65	54	64
Glu12	Ile8	17	-	-	-	-	Ala13	Ser9		77	58
	Ser9	34	100	100	25	28		Ala10		20	-
Ala13	Ser9		100	100	100	100	Ala14	Ala10		57	59
	Ala10		97	100	22	-		Ala11		73	-
Ala14	Ala10			27	84	100	Ala15	Ala11			5
	Ala11			27	-	-		Glu12			9
Ala15	Ala11				54	62	Ala16	Glu12			100
	Glu12				10	85	hSer (13-n)	Ala11	5	51	-
Ala16	Glu12					64		Glu12	-	65	36
	Ala13					72		Ala13		-	41
								Ala14		-	78

3.5. Wyznaczanie szybkości wymiany protonów amidowych alanin

Pomiaru szybkości wymiany protonów zwykle dokonuje się w wyniku analizy serii jednowymiarowych widm ¹H. Ilościowa analiza takich widm w przypadku badanych peptydów była niemożliwa bądź utrudniona ze względu na nakładanie się sygnałów (Ryc. 15a). Selekttywne znakowanie ¹⁵N alanin stwarza możliwości precyzyjnego pomiaru szybkości wymiany protonów amidowych tych aminokwasów w oparciu o korelacyjne techniki heterojądrowe. W Środowiskowym Laboratorium NMR przy IBB PAN opracowano metodę takich pomiarów, w której sekwencją pomiarową jest sekwencja gHSQC{¹H-¹⁵N} (*ang. gradient Heteronuclear Single Quantum Coherence*). Przy dobrym rozdzielaniu sygnałów pochodzących od protonów amidowych znakowanych aminokwasów w wymiarze protonowym wystarczające jest wykonanie serii jednowymiarowych widm gHSQC (Ryc. 15b). W przypadku degeneracji przesunięć chemicznych badanych protonów (jak na Ryc. 15b) pomoc-

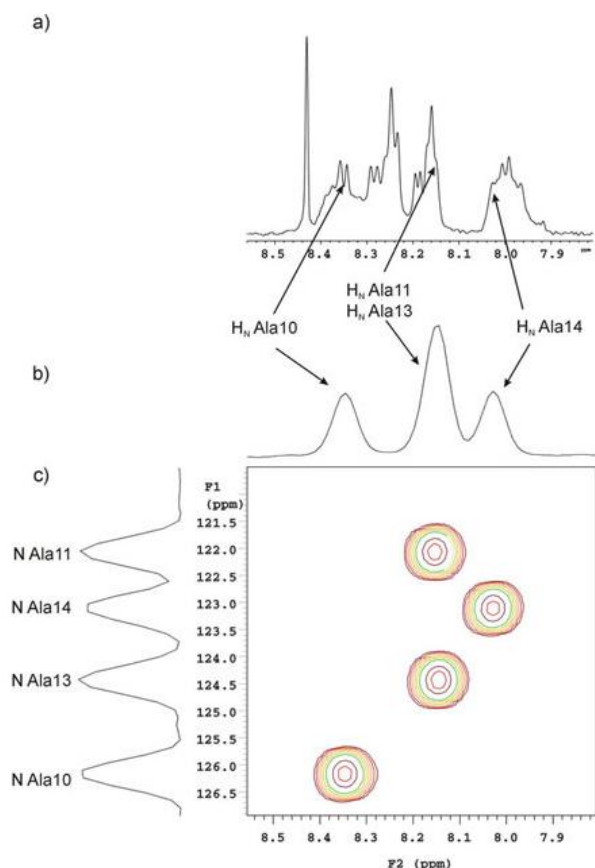
ne okazuje się rozciągnięcie widma w wymiarze azotowym i pomiar serii widm dwuwymiarowych (Ryc. 15c). Należy podkreślić, że działanie takie jest skuteczne jedynie w przypadku dobrego rozdzielania obserwowanych sygnałów w widmie gHSQC{¹H-¹⁵N}.

Na podstawie wykonanych pomiarów stałych szybkości wymiany chemicznej protonów amidowych i przez porównanie ich z oczekiwanymi wartościami obliczonymi dla konformacji rozwiniętej otrzymano współczynniki protekcji odpowiednich protonów amidowych alanin (Tabela 3).

W formie *apo* obserwuje się wartości współczynników protekcji znacząco większe od 1 dla wszystkich alanin, niezależnie od długości peptydu, co świadczy o przyjmowaniu konformacji różnej od rozciągniętej. Proponowane wyjaśnienie tego zjawiska jest takie, iż protony amidowe alanin peptydów PA_n w formie *apo* są zaangażowane w wiązania wodorowe albo/i częściowo izolowane od kontaktu z rozpuszczalnikiem.

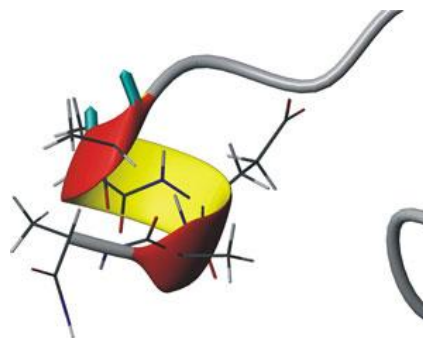
Tabela 3. Współczynniki protekcji protonów amidowych alanin w peptydach PA_n w formie *apo* (a) oraz w formie *holo* (b).

a)	forma <i>apo</i>				
	PA ₀	PA ₁	PA ₂	PA ₃	PA ₄
Ala10	2.8 ± 0.4	2.8 ± 0.5	2.6 ± 0.4	4.3 ± 0.5	3.1 ± 0.5
Ala11	2.7 ± 0.3	2.6 ± 0.3	2.1 ± 0.3	4.4 ± 0.4	2.7 ± 0.4
Ala13		2.0 ± 0.3	2.2 ± 0.3	4.3 ± 0.4	4.3 ± 0.7
Ala14			2.7 ± 0.3	4.1 ± 0.4	5.2 ± 0.7
Ala15				5.2 ± 0.5	4.1 ± 0.6
Ala16					4.3 ± 0.5
b)	forma <i>holo</i>				
	PA ₀	PA ₁	PA ₂	PA ₃	PA ₄
Ala10	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.3	1.2 ± 0.4	1.4 ± 0.3	1.6 ± 0.8
Ala11	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.2	1.1 ± 0.2	0.9 ± 0.2
Ala13		2.4 ± 0.7	7.6 ± 4.0	30.9 ± 9.7	61.2 ± 49.7
Ala14			7.2 ± 1.5	16.0 ± 3.3	21.7 ± 11.3
Ala15				8.0 ± 1.5	7.2 ± 1.6
Ala16					10.8 ± 3.1

Ryc. 15. a) Fragment jednowymiarowego widma ¹H peptydu PA₂, obszar przesunięć protonów amidowych; b) jednowymiarowe widmo gHSQC{¹H-¹⁵N} peptydu PA₂; c) dwuwymiarowe widmo gHSQC{¹H-¹⁵N} peptydu PA₂.

W formie *holo* obserwuje się istotne zmniejszenie wartości współczynników protekcji protonów amidowych alanin 10 i 11 w stosunku do formy *apo*. Związanie jonu La³⁺ wymusza zmiany konformacyjne co powoduje, że w peptydach wysyconych lantanem protony amidowe Ala10 i Ala11 nie są chronione przed rozpuszczalnikiem i następuje wymiana tak szybka jak w modelu kłębka statystycznego. Potwierdza to analiza struktur przestrzennych peptydów PA_n (Ryc. 16) w formie *holo* oraz statystyka wiązań wodo-

rowych dotyczących protonów amidowych tych reszt aminokwasowych.

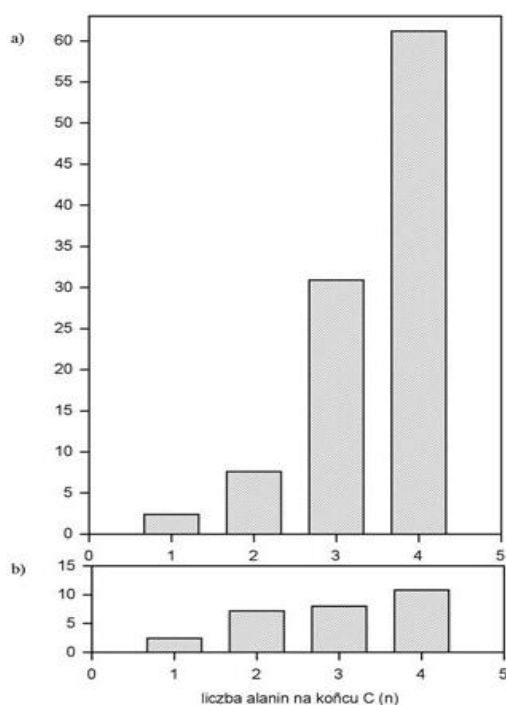
Ryc. 16. Peptyd PA₂ w formie *holo*; konformacja o najniższej energii z wyróżnionymi protonami amidowymi Ala10 i Ala11.

Wykładniczy wzrost protekcji protonów amidowych Ala13 oraz Ala(12+n) wraz ze wzrostem długości peptydu koresponduje ze zjawiskiem tworzenia się układu wiązań wodorowych stabilizujących helisę. Protony amidowe alanin znajdujących się na końcu C, Ala(12+n) (Ryc. 17b), mogą tworzyć wiązania wodorowe typu (i,i-3) bądź (i,i-4) z grupami karbonyłowymi innych reszt aminokwasowych cząsteczki.

W przypadku protonów amidowych Ala13 (Ryc. 17a) obserwowany wykładniczy wzrost współczynników protekcji protonów amidowych w funkcji liczby alanin na końcu C jest znacznie większy i ma to związek z tworzeniem układu wiązań wodorowych w helisie. Poza najkrótszym z analizowanych peptydów, PA₁, Ala13 nie jest ostatnią resztą aminokwasową znajdującą się na końcu C sekwencji. Wraz z wydłużaniem peptydu układ wiązań wodorowych stabilizujących helisę, w których uczestniczy Ala13, rozbudowuje się i w przypadku peptydu PA₄ alanina 13 tworzy charakterystyczne dla helisy □ wiązania wodorowe (i,i+4)/(i,i+4): H_N(Ala16) - CO(Ala13) oraz H_N(Ala13) - CO(Ser9).

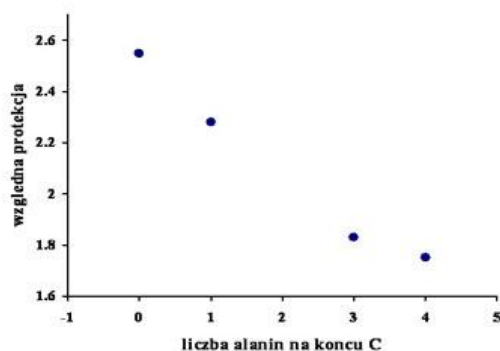
3.6. Protekcja protonów C-końcowej grupy (NH₂)

W przypadku protonów C-końcowej grupy NH₂ nie można policzyć oczekiwanej stałej szybkości wymiany k_{teor}



Ryc. 17. Wartości współczynników protekcji w funkcji liczby alanin na końcu C w peptydach PA_n w formie *holo*; a) dla alaniny 13 b) dla ostatniej na końcu C.

w konformacji rozwiniętej, dlatego też nie można mówić o protekcji tych protonów w takim samym sensie jak w przypadku protonów amidowych innych aminokwasów cząsteczki. W formie *apo* obserwuje się jednakową stałą szybkości wymiany (z dokładnością do błędów pomiarowych) dla obu protonów tej grupy. Inna sytuacja ma miejsce w peptydach związanych z jonami lantanu – jeden z protonów wymienia się znacząco szybciej niż drugi, a stosunek ich szybkości wymiany – względna protekcja $p_w = k(H_{2N})/k(H_{1N})$ – jest zależny od długości peptydu (Ryc. 18).



Ryc. 18. Względna protekcja protonów grupy końcowej NH_2 w peptydach PAN w formie *holo*. W przypadku peptydu PA_2 brak danych ze względu na nakładanie się sygnałów.

Założono, że szybciej wymieniający się proton H_{2N} nie jest uwikłany w wiązania wodorowe, a zatem jego stała szybkości wymiany uzyskana eksperymentalnie odpowiada wartości oczekiwanej dla C-końcowej grupy NH_2 w konformacji rozwiniętej. Dzięki temu obliczono współczynnik protekcji dla protonu H_{1N} w C-końcowej grupie NH_2 jako $k(H_{2N})/k(H_{1N})$.

Wyniki otrzymane w tej pracy wykorzystano do dalszych badań nad pierwszymi etapami procesu powstawania helisy. W szczególności posłużyły do obliczenia parametru propagacji (s) (równanie 29) oraz entalpii propagacji helisy. Wykazano, że entalpia pierwszych czterech kroków tworzenia helisy w układzie polialaninowym jest stała i wynosi $\Delta H_h = -4106 \pm 419$ J/mol. Parametry (s) podane w literaturze [59] odnoszą się do układów badanych w temperaturze $1^\circ C$ a ekstrapolacja do $25^\circ C$ daje w przypadku alaniny wartość $s_{Ala} = 1.3$. Dzięki przedstawionym badaniom pokazano, iż proces ten powinien być opisywany przez parametr $s_{Ala} = 1.54 \pm 0.04$ [85]. Jest to zgodne z wynikami innej grupy badaczy, którzy uzyskali wartość $s_{Ala} = 1.62 \pm 0.11$ [89]. Należy zwrócić uwagę na fakt iż dyskutowany parametr propagacji (s) opisuje równowagę między helisą a konformacją rozwiniętą, nie uściślając typu helisy. Jest to zgodne z analizą konformacyjną peptydów: konformacja typowa dla helisy 3_{10} dominuje w krótkich peptydach, PA_1 i PA_2 , wraz z wydłużaniem peptydu dominuje helisa α .

Prezentowane wyniki mogą pomóc w lepszym zrozumieniu mechanizmów fałdowania się białek. Zwijanie białek w komórce może odbywać się z pomocą wysoko wyspecjalizowanych białek opiekuńczych, chaperonów, które mają za zadanie zapobiegać nieprawidłowemu pofałdowaniu czy też agregacji [90]. W procesie zwijania białka przyjmują stabilną konformację natywną. Czasem jednak w wyniku mutacji czy też zmian środowiska zewnętrznego, na przykład pH lub temperatury, może dojść do nieodwracalnych zmian w strukturze drugo-, trzecio- i czwartorzędowej. Takie zmiany upośledzają pierwotne funkcje biologiczne białka. Część z takich białek jest degradowana w wyniku swoistej komórkowej "kontroli jakości". Jednak nie wszystkie nieprawidłowe białka są wychwytywane, zwłaszcza jeśli do zmian konformacyjnych dochodzi w przestrzeni pozakomórkowej [91]. Podejrzewa się, iż wiele chorób wywołanych jest nieprawidłowym procesem zwijania białek (*ang. folding diseases*). Do takich chorób zalicza się chorobę Alzheimera, scrapie, chorobę Creutzfelda-Jacoba, wrodzoną bezsenność, wrodzoną amyloidozę, kataraktę i wiele innych [91]. Te przykłady wykazują, w jak wielkim stopniu konformacja białka determinuje jego właściwości i funkcje w organizmie. W tym kontekście metody badania struktury oraz mechanizmów fałdowania się białek zyskują coraz bardziej na znaczeniu.

BIBLIOGRAFIA

1. Wüthrich, K., (1995), *Acta Cryst. D*, 51, 249-270
2. Akke, M., Palmer, A.G., III (1996), *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 911-912
3. Lundström, P., Akke, M., (2004), *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 928-935
4. Kay, L.E., (1998), *Nat. Struct. Biol.*, 5, (suplement NMR), 513-517
5. Ejchart, A., (1999a), "Zjawiska relaksacji molekularnej"; rozdział "Relaksacja jądrowa w badaniach dynamiki szkieletów białek", edytor Hawranek, P., Sobczyk, L., Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, str. 117-134
6. Buck, M., Rosen, M.K., (2001), *Science*, 291, 2329-2330
7. Abragam, A., (1978), "The Principles of Nuclear Magnetism", Oxford University Press
8. Hennel, J., (1997), "Wstęp do teorii magnetycznego rezonansu jądrowego", Wydawnictwo Instytutu Fizyki Jądrowej im. H. Niewodniczańskiego
9. Ejchart, A., Kozerski, L., (1988), "Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego ^{13}C " PWN

10. Ejchart, A., Gryff-Keller, A., (2004) „NMR w cieczach. Zarys teorii i metodologii”, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej
11. Günther, H., (1983) „Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego”, PWN
12. Cavanagh, J., Fairbrother, W.J., Palmer III, A.G., Skelton, N.J., (1996), “Protein NMR Spectroscopy”, Academic Press
13. Karplus, M., (1959), *J.Phys.Chem.*, 30, 11-15
14. van de Ven, F.J.M., (1995), „Multidimensional NMR in Liquids“, VCH Publishers, Inc
15. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, (1970), *Biochemistry*, 9, 3471-3479
16. Bystrov, V.F., Gavrilov, Y.D., Solkan, V.N., *J. Magn. Reson.* (1975), 19, 123
17. Noggle, J.H., Schirmer, R.E., (1971), “The Nuclear Overhauser Effect”, Academic, New York
18. Wüthrich, K., (1986), „NMR of Proteins and Nucleic Acids” Wiley-Interscience Publication
19. Neuhaus, D., Williamson, M., (1989), “The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis”, VCH Publishers, New York
20. Bothner-By, A.A., Stephens, R.L., Lee, J.-M., Warren, C.D., Jeanloz, R.W., (1984), *J. Am. Chem. Soc.*, 106, 811-813
21. Hull, W.E., (1994), “Experimental Aspects of Two-Dimensional NMR”, rozdział 2 z „Two-Dimensional NMR Spectroscopy” (second edition), edytorzy: Croasmun, W.R., Carlson, R.M.K., VCH, str. 67-457
22. Aue, P.W., Bartholdi, W.P., Ernst, R.R., (1976), *J. Chem. Phys.*, 64, 2229-2246
23. Bax, A., Davis, D.G., (1985), *J. Magn. Reson.*, 63, 207-213
24. Bax, A., Davis, D.G., (1985), *J.Magn.Reson.*, 65, 355-360
25. Braunschweiler, L., Ernst, R.R., (1983), *J. Magn. Reson.*, 53, 521-528
26. Jeener, J., Meier, Megier, H., Bachmann, P., Ernst, R.R., (1979), *J. Chem. Phys.*, 71, 4546-4553
27. Bodenhausen, G., Ruben, G.J., (1980), *Chem.Phys.Lett.*, 69, 185-189
28. Kay, L.E., Keifer, P., Saarinen, T., (1992), *J. Am. Chem. Soc.* 114, 10663-10665
29. Palmer III, A.G., Cavanagh, J., Wright, P.E., Rance, M., (1991), *J. Magn. Reson.*, 93, 151-170
30. Konraxis, G., Stonehouse, J., Laue, E.D., Keeler, J., (1994), *J. Magn. Reson. Ser. A*, 111, 70-76
31. Levitt, M.H., Freeman, R., (1981), *J.Magn.Reson.*, 43, 502-507
32. Levitt, M.H., Freeman, R., Frenkiel, T., (1982), *J.Magn.Reson.*, 50, 345-348
33. Hurd, R.E., John, B.K., (1991), *J.Magn.Reson.*, 91, 648
34. Vuister, G.W., Boelens, R., Kaptein, R., Hurd, R.E., John, B., van Zijl, P.C.M., (1991), *J.Am.Chem.Soc.*, 113, 9688-9690
35. Ruiz-Cabello, J., Vuister, G.W., Moonen, C.T.W., van Geldener, P., Cohen, J.C., van Zijl, P.C.M., (1992), *J.Magn.Reson.*, 100, 282
36. Braun, S., Kalinowski, H.-O., Berger, S., (1996), “100 and More Basic NMR Experiments”, VCH Publishers, Weinheim
37. Ejchart, A., (1998), *Bulletin of the PAS, Chem.*, 46, 117-131
38. Blumenthal, L.M., (1953), “Theory and Applications of Distance Geometry”, Cambridge University Press
39. Crippen, G.M., Havel, T. F., (1988), “Distance Geometry and Molecular Conformation”, Taunton, UK: Research Studies Press
40. Güntert, P., (1998), *Quat.Rev.Biophys.*, 31, 145-237
41. Allen, M.P., Tildesley, D.J., (1987), “Computer Simulation in Liquids”, Oxford: Clarendon Press
42. Kirkpatrick, S., Gelatt, Jr., C.D., Vecchi, M.P., (1983), *Science*, 220, 671-680
43. Brünger, A.T., Nigels, M., (1993), *Q.Rev.Biophys.*, 26, 49-125
44. Nigels, M., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., (1988), *FEBS Lett.*, 229, 317-324
45. Bae, D.S., Huang, D.J., (1987), *Mech.Struct.Mech.*, 15, 359-382
46. Güntert, P., Mumenthaler, C., Wüthrich, K., (1997), *J.Mol.Biol.*, 273, 283-298
47. Jain, A., Vaidehi, N., Rodrigues, G., (1993), *J.Comp.Phys.*, 106, 258-268
48. Katz, H., Walter, R., Somorjay, R.L., (1979), *Computers&Chemistry*, 3, 25-32
49. Kneller, G.R., Hinsen, K., (1994), *Phys.Rev.E*, 50, 1559-1564
50. Mathiowetz, A. M., Jain, A., Karasawa, N., Goddard III, W. A. (1994). *Proteins*, 20, 227-247
51. Mazur, A.K., Abagyan, R.A. (1989), *J.Biomol.Struct.Dynam.*, 4, 815-832
52. Mazur, A. K., Dorofeev, V.E., Abagyan, R.A. (1991), *J.Comp.Phys.*, 92, 261-272
53. Rice, L.M., Brünger, A.T. (1994), *Proteins*, 19, 277-290
54. Stein, E. G., Rice, L.M., Brünger, A. T. (1997), *J.Magn.Reson.*, 124, 154-164
55. Groth, M., Malicka, J., Czapiewski, C., Ołdziej, S., Łankiewicz, L., Wiczak, W., Liwo, A., (1999), *J.Biomol.NMR*, 69, 315-330
56. Oleszczuk, M., (2005), „Badania konformacyjne modelowych fragmentów białek wiążących jony wapnia”, praca doktorska, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
57. Barlow, D.J., Thornton, J.M., (1988), *J.Mol.Biol.*, 201, 601-619
58. Fodje, M.N., Al-Karadaghi, S., (2002), *Prot.Eng.*, 15, 353-358
59. Schultz, G.E., Schirmer, R.H., (1990), “Principles of Protein Structure”, Springer-Verlag (ninth printing)
60. Zimm, B.H., Bragg, J.K., (1959), *J.Chem.Phys.*, 31, 526-535
61. Lifson, S., Roig, A., (1961), *J.Chem.Phys.*, 34, 1963-1974
62. Davies, D.R., (1964), *J.Mol.Biol.*, 9, 605-612
63. Prothero, J.W., (1966), *Biophys.J.*, 6, 367-370
64. Cook, D.A., (1967), *J.Mol.Biol.*, 29, 167-171
65. Ptitsyn, O.B., (1969), *J.Mol.Biol.*, 42, 501-510
66. Ptitsyn, O.B., Finkelstein, A.V., (1970), *Biofizika (ZSRR)*, 15, 757-768
67. Blagdon, D.E., Goodman, M., (1975), *Biopolymers*, 14, 241-245
68. Chou, P.Y., Fasman, G.D., (1974), *Biochemistry*, 13, 211-222
69. Chakrabarty, A. and Baldwin, R.L., (1995) *Adv.Protein Chem.*, 46, 141-176
70. Cierpicki, T., Zhukov, I., Byrd, R.A., Otlewski, J., (2002), *J.Magn.Reson.*, 157, 178-180
71. Forsen, S., Hoffman, R.A., (1963), *J.Chem.Phys.*, 39, 2892-2901
72. Wójcik, J., Rusczyńska, K., Zhukov, I., Ejchart, A., (1999), *Acta Biochim.Polon.*, 46, 651-663
73. Forsen, S., Hoffman, R.A., (1964), *J.Chem.Phys.*, 40, 1189
74. Led, J.J., Gesman, H., Abildgaard, F., (1989), *Methods in Enzymology*, 176, 311-329
75. Vold, R.L., Waugh, J.S., Klein, M.P., Phepls, D.D., (1968), *J.Chem.Phys.*, 48, 3831
76. Lian, L.-Y., Roberts, G.C.K., (1993), rozdział 6 z Roberts, G.C.K “NMR of Macromolecules. A Practical Approach”, Oxford University Press
77. Rhol, C.A., Doig, A.J., (1996), *Protein Sci.*, 5, 1687-1696
78. Wang, L., O’Connell, T., Tropsha, A., Hermans, J., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 10924-10928
79. Garipey, J., Sykes, B.D., Hodges, R.S., (1983), *Biochemistry*, 22, 1765-1772
80. Dadlez, M., Góral, J., Bierzynski, A., (1991), *FEBS Lett.*, 282, 143-146
81. Horrocs, W.DeW., Jr, (1993), *Methods Enzymol.*, 226, 495-538
82. Lee, L., Sykes, B.D., (1983), *Biochemistry*, 22, 4366-4373
83. Wójcik, J., Góral, J., Pawłowski, K., Bierzynski, A., (1997), *Biochemistry*, 36, 680-687
84. Siedlecka, M., Goch, G., Ejchart, A., Sticht, H., Bierzynski, A., (1999), *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 96, 903-908
85. Goch, G., Maciejczyk, M., Oleszczuk, M., Stachowiak, D., Malicka, J., Bierzynski, A., (2003), *Biochemistry*, 42, 6840-6847
86. Kulawińska, R., (2001), „Badanie struktury peptydu analogu trzeciej pętli wiążącej kalmoduliny”, praca magisterska, Uniwersytet Warszawski, Wydział Fizyki

87. Rusczyńska, K., (1999), „Badanie magnetycznego rezonansu jądrowego struktur i stabilności analogów III pętli białka kalmoduliny”, praca magisterska, Uniwersytet Warszawski, Wydział Fizyki
88. Brünger, A.T., (1992), “X-PLOR, version3.1. A system for X-ray crystallography and NMR”, New Haven: Yale University Press
89. Lin, J.C., Barua, B., Andersen, N.H., (2004), J.Am.Chem.Soc., 126, 13679-13684
90. Gething, M-J., Sambrook, J., (1992), Nature, 355, 33-45
91. Thomas, P.J., Qu, B-H., Pedersen, P.L., (1995), Trends Biochem. Sci., 20, 456-459