



УДК 577.322.4.591.145.2-543.422.23

ЯМР-ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ
ТОКСИНА 3 *NAJA NAJA SIAMENSIS*

Кондаков В. И., Арсеньев А. С., Уткин Ю. Н.,
Карлссон Е.,* Гуревич А. З., Цетлин В. И.,
Быстров В. Ф., Иванов В. Т.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва;

* Институт биохимии, Упсала, Швеция

Проведен анализ ^1H -ЯМР-спектров (300 и 500 МГц) нейротоксинов длинного типа — токсина 3 *Naja naja siamensis* (S-T3), его Lys(Ac)-производных и близкого гомолога — токсина 3 *Naja naja naja* (N-T3). Методом двойного резонанса в сочетании с разностной спектроскопией и использованием серии модифицированных по остаткам лизина ацетильных и трифторацетильных производных токсина S-T3 проведено отнесение сигналов и охарактеризовано микроокружение ряда функционально важных остатков в его молекуле. Из анализа pH-зависимости химических сдвигов сигналов в ^1H - и ^{19}F -ЯМР-спектрах токсина S-T3 определена обширная область, затрагиваемая конформационным переходом между двумя состояниями молекулы со средней точкой при pH 5,4. Конформационный переход, обусловленный изменением ионизационного состояния остатка His²², изменяет доступность имидазольного кольца к растворителю, а также расстояние между боковыми цепями функционально важных остатков Lys²⁷ и Lys⁵³. По данным ЭПР для производного S-T3, диспепсического по ϵ -аминогруппам указанных остатков (-196°C), расстояние между спиновыми метками равно 18 Å при pH 7,5 и 23 Å при pH 3,5. Вместе с тем показано, что наблюдается большое сходство пространственной организации токсина S-T3 в кристаллическом состоянии и в растворе.

В настоящее время из ядов змей выделено и охарактеризовано более 60 постсинаптических нейротоксинов, которые подразделены на две группы [1–4]. К группе «коротких» нейротоксинов отнесены полипептиды с 60–62 аминокислотными остатками и четырьмя дисульфидными мостиками; к группе «длинных» нейротоксинов — полипептиды с 71–74 остатками и пятью дисульфидными мостиками. Постсинаптические нейротоксины специфически связываются с ацетилхолиновым рецептором мембран нервных и мышечных клеток, блокируя передачу нервных импульсов в живых организмах [1, 2].

Высокая степень гомологии аминокислотных последовательностей и дисульфидных связей, а также сходство в механизме действия предполагает подобие пространственной организации нейротоксинов обеих групп [5, 6]. Действительно, результаты рентгеноструктурного анализа показали, что длинные нейротоксины (токсин 3 *Naja naja siamensis* [7] и α -бунгаротоксин *Bungarus multicinctus* [8, 9]) и короткие нейротоксины (эрабутоксипы *Laticauda semifasciata* [10–12]) имеют близкие трехмерные структуры. Однако, несмотря на сходство кристаллических структур, между нейротоксинами обеих групп существуют различия, проявляющиеся в кинетике связывания с ацетилхолиновым рецептором [13], а также в ряде иммунологических, биохимических и фармакологических свойств [3].

Для объяснения функциональных различий между короткими и длинными нейротоксинами необходимо привлечение данных о динамических свойствах и конформационных изменениях их пространственных структур при варьировании параметров среды вблизи физиологических условий и при связывании их с мишенью биологического действия — ацетилхолиновым рецептором. В этом отношении достаточно хорошо изучены короткие нейротоксины. С помощью различных физико-химических методов получена детальная информация о конформационных особен-

$\begin{matrix} 1 & 10 & 20 & 30 & 40 \\ N. n. siamensis \beta & IRCF----ITPDITSKDCPNG---HVCYTKTWCDAFCSIRGKRVD \\ N. n. naja \beta & IRCF----ITPDITSKDCPNG---HVCYTKTWCDGFCFSIRGKRVD \\ & 50 & 60 & 70 \\ & LGCAATCPTVK---TGVDIQQCST---DNCNPFPTKRKP \\ & LGCAATCPTVR---TGVDIQQCST---DNCNPFPTKRKP \end{matrix}$

Рис. 1. Аминокислотные последовательности токсина β *N. n. siamensis* [23] и токсина β *N. n. naja* [24]. Нумерация остатков приведена согласно работе [3]

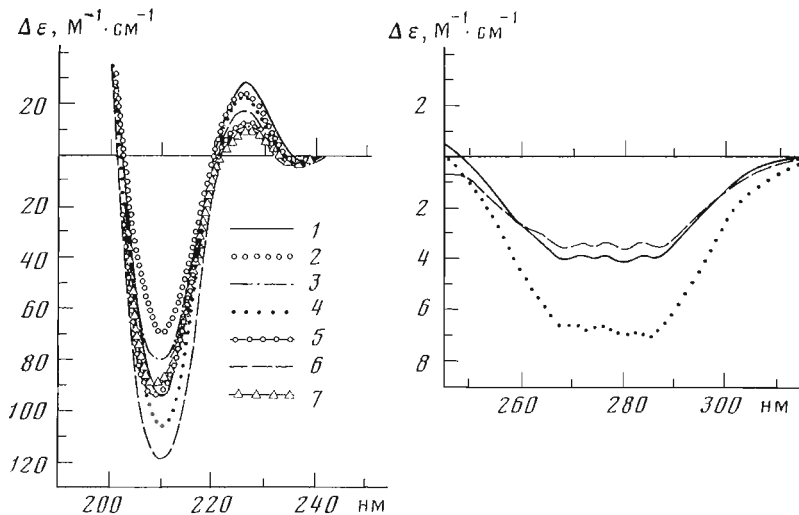


Рис. 2. КД-спектры (H_2O , pH 7,5; $22^\circ C$) токсина S-T3 (1), его моноацетильных производных по остаткам Pe^1 (2), Lys^{15} (3), Lys^{27} (4), Lys^{39} (5), Lys^{53} (6), Lys^{75} (7)

ностях нейротоксинов короткого типа в растворе [14–20], а также о топографии связывания с ацетилхолиновым рецептором [21, 22]. О структурных свойствах длинных нейротоксинов в растворе пока известно немного. Необходимо также отметить, что результаты рентгеноструктурного анализа токсина β *N. n. siamensis* и α -бунгаротоксина *B. multicinctus* свидетельствуют о ряде конформационных различий данных нейротоксинов, что позволило авторам работы [4] предположить существование структурных подгрупп длинных нейротоксинов.

Настоящая работа посвящена ЯМР-исследованию конформационных особенностей токсина β *N. n. siamensis* (S-T3) в растворе. Для отнесения сигналов в 1H -ЯМР-спектрах использовалась также серия моноацетильных производных этого токсина по ϵ -аминогруппам остатков лизина 15, 27, 39, 53 и 75, α -аминогруппе N-концевого остатка изолейцина и близкий гомолог токсина S-T3 — токсин β из яда кобры *N. n. naja* (N-T3) (см. рис. 1).

Ранее нами были использованы спин-меченные по ϵ -аминогруппам остатков лизина производные токсина S-T3 для исследования топографии связывания длинных нейротоксинов с ацетилхолиновым рецептором [25, 26]. Исследование моноацетильных производных представляет самостоятельный интерес для выяснения возможных изменений пространственной структуры молекулы токсина β при модификации ϵ -аминогрупп остатков лизина. При ацетилировании любой из шести аминогрупп в молекуле токсина S-T3 сохраняется высокая токсичность (67% токсичности нативной молекулы [23]). Близость по форме КД-спектров S-T3 и серии его ацетильных производных (рис. 2) также указывает на близость конформаций модифицированных аналогов и нативного нейротоксина. Это позволяет при анализе ЯМР-спектров серии моноацетильных

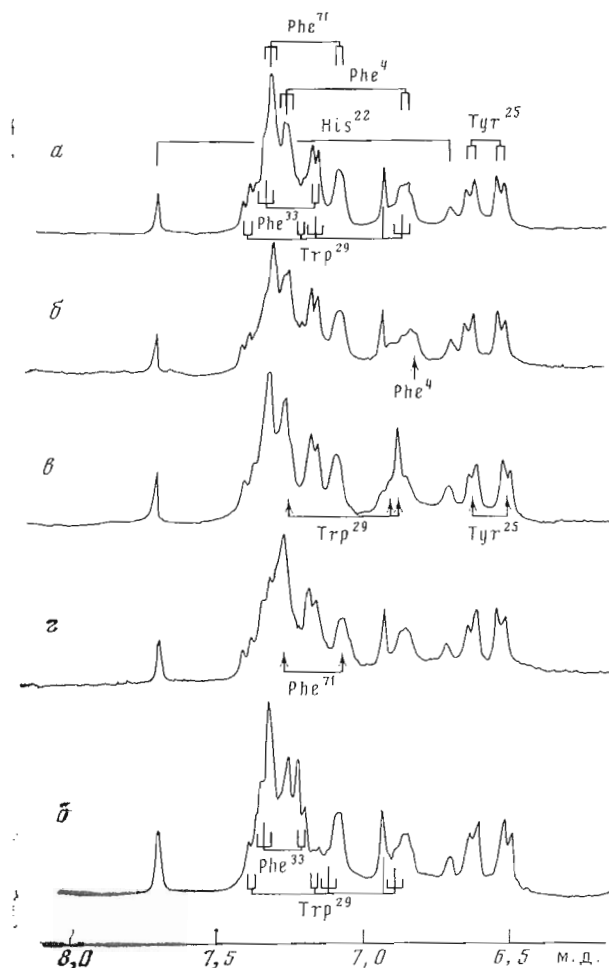


Рис. 3. Области сигналов от ароматических протонов ^1H -ЯМР-спектров (300 МГц, H_2O , pH 7,5; 32°C) токсина S-T3 (а) его $\text{Phe}^1(\text{Ac})$ (б), $\text{Lys}^{27}(\text{Ac})$ - (в), $\text{Lys}^{75}(\text{Ac})$ -производного (г) и токсина N-T3 (д). Схематически показаны сигналы отнесенных спиновых систем ароматических протонов. Стрелками отмечены сигналы, изменяющие химический сдвиг при ацетилировании соответствующей аминокислотной группы

производных проводить отнесение сигналов, основанное на данных рентгеноструктурного анализа токсина S-T3 [7].

Отнесение сигналов ароматических протонов. Токсины S-T3 и N-T3 содержат ароматические остатки в гомологичных положениях аминокислотной последовательности: His^{22} , Tyr^{25} , Trp^{29} и $\text{Phe}^{4,33,71}$ (рис. 1). Сигналы ароматических протонов остатков His^{22} , Tyr^{25} и Trp^{29} токсина S-T3 выделены и отнесены нами ранее [25]. Сочетанием методов двойного резонанса и разностной спектроскопии в ^1H -ЯМР-спектрах токсинов S-T3 и N-T3 найдены спиновые системы ароматических протонов остатков Tyr^{25} и Trp^{29} , а также сигналы протонов C2,6-H и C3,5-H всех фенилаланиновых остатков. Сигналы ароматических протонов остатков $\text{Phe}^{4,33,71}$ расположены в сильно перекрывающейся области спектра (7,4–7,3 м.д., рис. 3). Это помешало выделить их сочетанием гомоядерного двойного резонанса и разностной спектроскопии в ^1H -ЯМР-спектрах обоих токсинов.

Аминокислотные последовательности нейротоксинов различаются только в двух положениях: Ala^{32} и Lys^{53} в токсине S-T3 замещены соответственно на Gly^{32} и Arg^{53} в токсине N-T3 (рис. 1). Сравнение спектров ароматических областей этих токсинов (рис. 3а, д) показывает, что достаточно заметное различие в химических сдвигах наблюдается только для дублетного сигнала ($\delta 7,17$ м.д., табл. 1) от протонов C2,6-H одного из

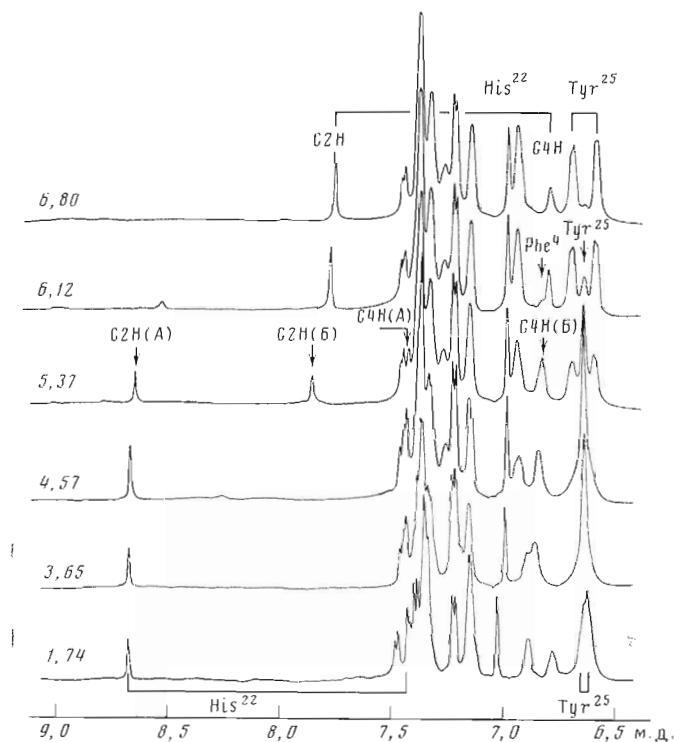


Рис. 4. ^1H -ЯМР-спектры (500 МГц) сигналов от ароматических протонов токсина S-T3 при различных значениях pH ($^2\text{H}_2\text{O}$, 10°C). Стрелками отмечены компоненты сигналов остатков Phe⁴, Tyr²⁵ и His²², отвечающие состоянию молекулы токсина при протонировании остатка His²². Цифры в левой части рисунка указывают значения pH

остатков фенилаланина. Такой сдвиг может быть обусловлен различием в микроокружении остатка Phe³³, вызываемым замещением Ala³² на Gly³² в токсине N-T3. По данным рентгеноструктурного анализа токсина S-T3 [7], остатки Phe¹ и Phe⁷¹ достаточно удалены от остатков Ala³² и Lys⁷⁵ и не могут испытывать влияние отмеченных замен в аминокислотной последовательности. Небольшие различия в химических сдвигах ($\sim 0,02$ – $0,03$ м.д.) ароматических протонов остатка Trp²⁹ в спектрах обоих токсинов могут объясняться каждой из замен. Сигналы от выделенных ароматических протонов остатков Phe⁴ и Phe⁷¹ имеют одинаковые химические сдвиги в спектрах токсинов S-T3 и N-T3 (рис. 3а, б). Поэтому их отнесение выполнено сравнением спектров нативного и шести моноацетильных производных токсина S-T3, снятых при идентичных экспериментальных условиях.

Ацетилирование аминогруппы в молекуле полипептида изменяет микроокружение пространственно сближенных с ней аминокислотных остатков, приводя к изменению химических сдвигов соответствующих протонных сигналов. Селективное ацетилирование α -аминогруппы остатка Ile¹ и ϵ -аминогруппы остатка Lys⁷⁵ в токсине S-T3 вызывает изменение химических сдвигов ароматических протонов остатков Phe⁴ и Phe⁷¹ (рис. 3а, б, г, табл. 1). По данным рентгеноструктурного анализа [7], с ароматическим кольцом остатка Phe¹ сближена α -аминогруппа остатка Ile¹, а с ароматическим кольцом остатка Phe⁷¹ — ϵ -аминогруппа остатка Lys⁷⁵. Поэтому сигналы от остатков фенилаланина, изменяющие химический сдвиг при ацетилировании остатка Ile¹ (рис. 3б), следует приписать остатку Phe⁴. Сигналы другого остатка фенилаланина, изменяющие химический сдвиг при ацетилировании ϵ -аминогруппы остатка Lys⁷⁵, отнесены соответственно к остатку Phe⁷¹ (рис. 3г).

Отнесение сигналов ароматических протонов остатков фенилаланина, полученное в результате сравнительного исследования серии моноацетильных производных токсина S-T3, совпадает с результатами работы

Химические сдвиги (δ , м. д.) ароматических и метильных протонов токсина S-T3 и их изменения ($\Delta\delta$, м. д.) при переходе к его моноацетильным производным и токсину N-T3

Остаток	Протоны группы	S-T3	Моно-Ас-производные S-T3 по остатку					N-T3	
			He ¹	Lys ¹⁵	Lys ²⁷	Lys ³⁹	Lys ⁵³		Lys ⁷⁵
Tyr ²⁵	C2,6-H	6,65							
	C3,5-H	6,54							
Trp ²⁹	C2-H	6,95							
	C4(7)-H	7,41							
	C7(4)-H	7,23							
	C5(6)-H	7,19							-0,03
	C6(5)-H	6,90							-0,03
Phe ⁴	C2,6-H	6,88	-0,02						
Phe ³³	C2,6-H	7,17							0,07
	C3,5-H	7,33							0,03
Phe ⁷¹	C2,6-H	7,09						0,02	
	C3,5-H	7,32						-0,05	
He ¹	C ^o H ₃	0,76	-0,08						
He ¹⁽⁸⁾	C ^o H ₃	0,77	0,02	0,02					
He ⁸	C ^o H ₃	1,10		-0,04					
He ³⁶	C ^o H ₃	0,98				-0,02			-0,02
	C ^o H ₃	0,93				-0,02			-0,03
He ⁵⁹	C ^o H ₃	0,88			-0,02		-0,02		-0,02
	C ^o H ₃	0,56			0,02		-0,02		-0,02
Val ²³	C ^o H ₃	0,89	-0,02						
Val ⁴¹	C ^o H ₃	0,58			0,02	0,03			0,03
Val ⁵²	C ^o H ₃	0,81					0,03		0,03
	C ^o H ₃	0,72					0,04		0,03
Val ⁵⁷	C ^o H ₃	0,82			-0,04		-0,04		-0,04
	C ^o H ₃	0,64			-0,03		-0,03		-0,02

[27], где отнесение выполнено с помощью ядерного эффекта Оверхаузера.

pH-Зависимость химических сдвигов сигналов от ароматических протонов. При изменении pH водного раствора в спектрах ЯМР токсина S-T3 возникает ряд особенностей, связанных с ионизацией имидазольного кольца остатка His²² [25, 28], однако из-за сильного уширения компонентов сигналов от C2- и C4-протонов гистидина при использованных ранее экспериментальных условиях (32°С, 300 МГц) невозможно надежно проследить за ходом pH-зависимого конформационного перехода. Поэтому было проведено исследование pH-зависимости химических сдвигов сигналов от ароматических протонов токсина S-T3 при температуре 10°С и 500 МГц (рис. 4). Во всем использованном интервале значений pH от 1,7 до 7,2 наблюдается относительно узкий сигнал от протона C2-H имидазольного кольца остатка His²², который расщепляется на два компонента (А и Б), имеющие различные pH-зависимые химические сдвиги и интегральные интенсивности (рис. 4, 5). Согласование полученных экспериментальных результатов для кривых pH-зависимостей химических сдвигов компонентов А и Б с теоретическим уравнением (см. «Экспериментальную часть») дает значения pK_a $6,92 \pm 0,06$ ($h=0,89$) и $4,66 \pm 0,03$ ($h=1,56$) соответственно (рис. 5а), где h — коэффициент Хилла. Для pH-зависимостей интегральных интенсивностей компонентов А и Б (рис. 5б) pK_a равно $\sim 5,40$, а коэффициенты Хилла — 0,95 и 1,26 соответственно. Заниженное значение pK_a 4,66 для конформационного состояния Б свидетельствует о сближенности имидазольного кольца с положительно заряженной ионогенной группой (возможно, с α -аминогруппой остатка He¹ [7]) и/или об участии имидазольного кольца остатка His²³ в водородной связи и/или о гидрофобном окружении. Значение pK_a 6,92 (в состоянии А) хорошо согласуется с pK_a 6,6–6,9 гистидинового остатка

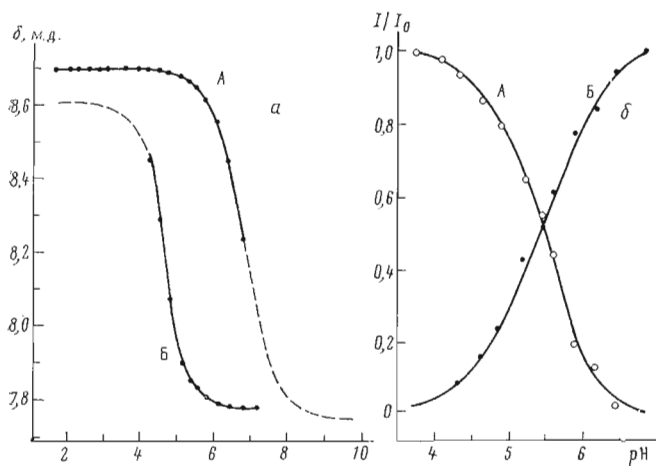
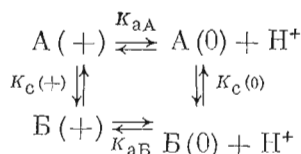


Рис. 5. pH-Зависимости химических сдвигов (а) и интегральной интенсивности (б) компонентов А и Б сигнала от протона С2-Н остатка His²² токсина S-T3. Пунктирными линиями показана экстраполяция кривых при расчете значений рK_а

в модельных пептидах [29, 30], указывая на экспонированность имидазольного кольца His²² в среду.

Завышенные значения коэффициента Хилла для процесса протонирования остатка His²² в состоянии Б говорят о возможной конформационной перестройке в молекуле токсина S-T3, вызываемой изменением состояния ионизации имидазольного кольца. Поскольку в токсине S-T3 кроме имидазольного кольца остатка His²² нет других ионогенных групп (см. ниже), изменяющих состояние ионизации в интервале pH 4–7, то pH-зависимое изменение интенсивности сигналов от ароматических протонов остатков Phe⁴, Tyr²⁵ (рис. 4), а также ряда сигналов от метильных и C^αH-протонов в этом интервале pH должно свидетельствовать о наличии в молекуле длинного нейротоксина обширной области, затрагиваемой изменением ионизационного состояния остатка His²².

Авторами работы [31] предложена следующая схема для аналогичного процесса конформационного равновесия между протонированной и депротонированной формами остатка His²² в молекуле гомологичного нейротоксина — токсина В *Naja naja*, которая согласуется с полученными нами данными для токсина S-T3:



где А(+), А(0) — протонированная и депротонированная формы His²² в конформационном состоянии А соответственно, В(+), В(0) — то же в конформационном состоянии В, K_c — константы равновесия.

Остаток Tyr²⁵ является инвариантным в коротких и длинных нейротоксинах. В длинных нейротоксинах S-T3 [25, 27, 28], токсине В *Naja naja* [32] и α-бунгаротоксине *B. multicinctus* [32] сигналы этого остатка не имеют характерной температурной зависимости полуширины, как для коротких нейротоксинов [14–16], в которых отмечено стерическое затруднение подвижности фенольного кольца остатка Tyr²⁵. Кроме собственного значения рK_а 11,4 ароматические протоны остатка Tyr²⁵ в спектрах ¹H-ЯМР токсина S-T3 испытывают влияние изменения ионизационного состояния остатка His²² (рK_а ~ 5,6), аминокруппы с рK_а ~ 9,5 и карбоксильной группы, титрующей в интервале значений pH 2,5–3,5

Параметры, характеризующие зависимость химических сдвигов сигналов ароматических протонов токсина *S. n. siamensis* от pH (2H₂O, 32° С)

Оста-ток	Протоны группы	δ_{H^+} , м. д.	pK_a^1	$\Delta\delta_1$, м. д.	h_1	pK_a^2	$\Delta\delta_2$, м. д.	pK_a^3	$\Delta\delta_3$, м. д.	pK_a^4	$\Delta\delta_4$, м. д.
His ²²	C2-H	8,66	~3,7	0,03		*	0,91				
Tyr ²⁵	C2,6-H	6,61	~3,2	0,02		~5,6	-0,05	~9,5	0,04	11,42	0,17
	C3,5-H	6,56	~3,2	-0,03		~5,6	0,05	~9,5	0,05	11,40	0,28
Trp ²⁹	N1-H	10,29	2,94	-0,57	0,86						
	C2-H	6,99	3,0	0,05	0,89			~10,6	-0,02		
	C4(7)-H	7,44	~2,5	0,03				~10,6	0,02		
	C7(4)-H	7,12	3,35	-0,10	0,96			9,5	-0,06		
	C5(6)-H	7,05	3,51	-0,06	1,0			~10,7	-0,02		
	C6(5)-H	6,73	3,46	-0,15	1,0			9,42	-0,06		
Phe ⁴	C2,6-H	6,82	~3,3	0,03		~5,6	-0,08				
	C3,5-H	7,29	~3,3	0,02							
Phe ³³	C2,6-H	7,19	~3,0	0,02							
	C3,5-H	7,37	~3,0	0,02							
Phe ⁷¹	C2,6-H	7,11	~3,2	0,02							
	C3,5-H	7,31	~3,2	0,02		~5,6	-0,02				

* Сигнал C₂H-протона His²² в интервале pH 4,5—6,5 проявляется в виде двух уширенных пиков. Положительные значения $\Delta\delta$ соответствуют сдвигу сигнала в слабое поле при понижении pH.

(рис. 6, табл. 2). Протонирование остатка His²² вызывает сильное уширение и изменение химических сдвигов сигналов ароматических протонов остатка Tyr²⁵, которое наблюдается в интервале значений pH 4—7 при 32° С и рабочей частоте спектрометра 300 МГц, что свидетельствует об обмене между двумя конформационными состояниями этого остатка. Снижение температуры замедляет скорость обмена между двумя формами токсина S-T3. Это хорошо наблюдается в ¹H-ЯМР-спектрах (500 МГц), представленных на рис. 4.

Модификация ϵ -аминогруппы остатка Lys²⁷ приводит к небольшим изменениям химических сдвигов сигналов ароматических протонов остатка Tyr²⁵ (табл. 1). Кроме того, на кривых pH-зависимости химического сдвига ароматических сигналов остатка Tyr²⁵ в Lys²⁷(Ac)-аналоге токсина S-T3 отсутствует перегиб при pH~9,5, что указывает на принадлежность данного значения pK_a патиного токсина к ϵ -аминогруппе остатка Lys²⁷ (рис. 6). Если приписать изменение химического сдвига сигналов от ароматических протонов остатка Tyr²⁵ в интервале pH 2,5—3,5 в токсине S-T3 влиянию пространственно сближенной карбоксильной группы остатка Asp¹² [7], можно заключить, что ацетилирование ϵ -аминогруппы остатка Lys²⁷ вызывает повышение значения pK_a остатка Asp¹², как следует из наблюдаемого перегиба зависимости химических сдвигов этих сигналов в интервале pH~3,0—4,0 для [Lys²⁷(Ac)]S-T3 (рис. 6б).

Остаток Trp²⁹, так же как и остаток Tyr²⁵, является инвариантным в длинных и коротких нейротоксинах. Результаты исследования pH-зависимости химических сдвигов сигналов от ароматических протонов остатка Trp²⁹ указывают на влияние ионизации двух карбоксильных групп с pK_a ~2,5 и ~3,3 и двух аминогрупп с pK_a ~9,5 и ~10,7 (рис. 6, табл. 2). По данным рентгеноструктурного анализа [7], с индольным кольцом остатка Trp²⁹ пространственно сближены остатки Asp³¹ и Asp¹². О суммарном влиянии карбоксильных групп этих остатков на ход кривых pH-зависимости ароматических протонов остатка Trp²⁹ свидетельствуют значения pK_a и коэффициентов Хилла, которые различны для каждого ароматического протона (табл. 2).

Ацетилирование ϵ -аминогрупп остатков Lys²⁷ (рис. 3в), Lys³⁹ и Lys⁵³ приводит к изменению химического сдвига сигналов от ароматических протонов остатка Trp²⁹, что указывает на влияние каждого из перечисленных лизиновых остатков на локальное окружение индольного кольца остатка Trp²⁹ (табл. 1). На кривых pH-зависимости химических сдвигов

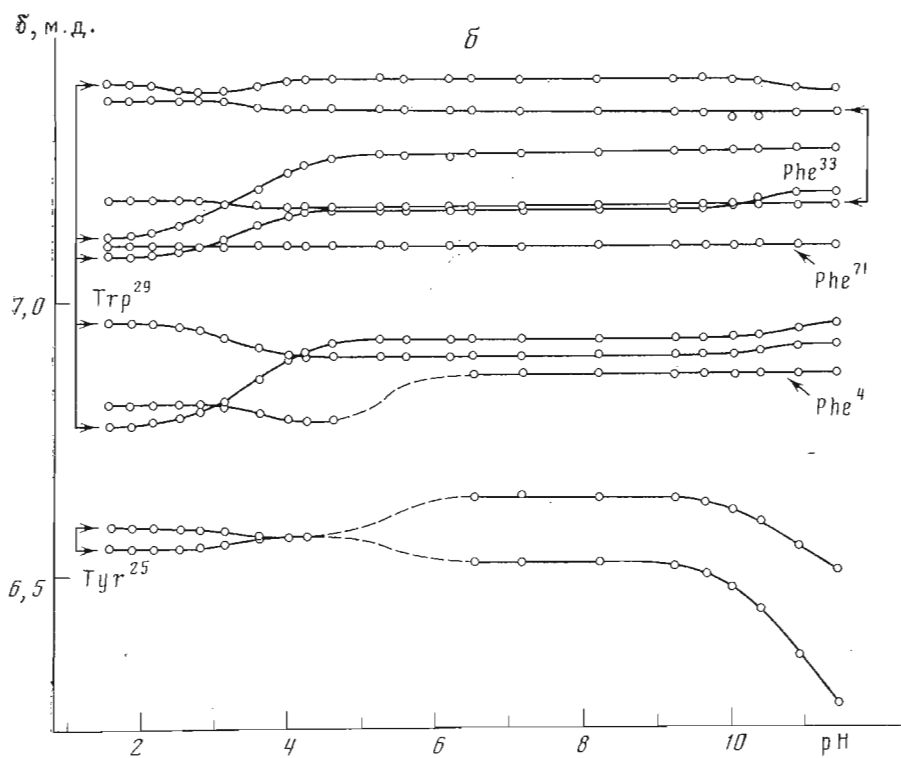
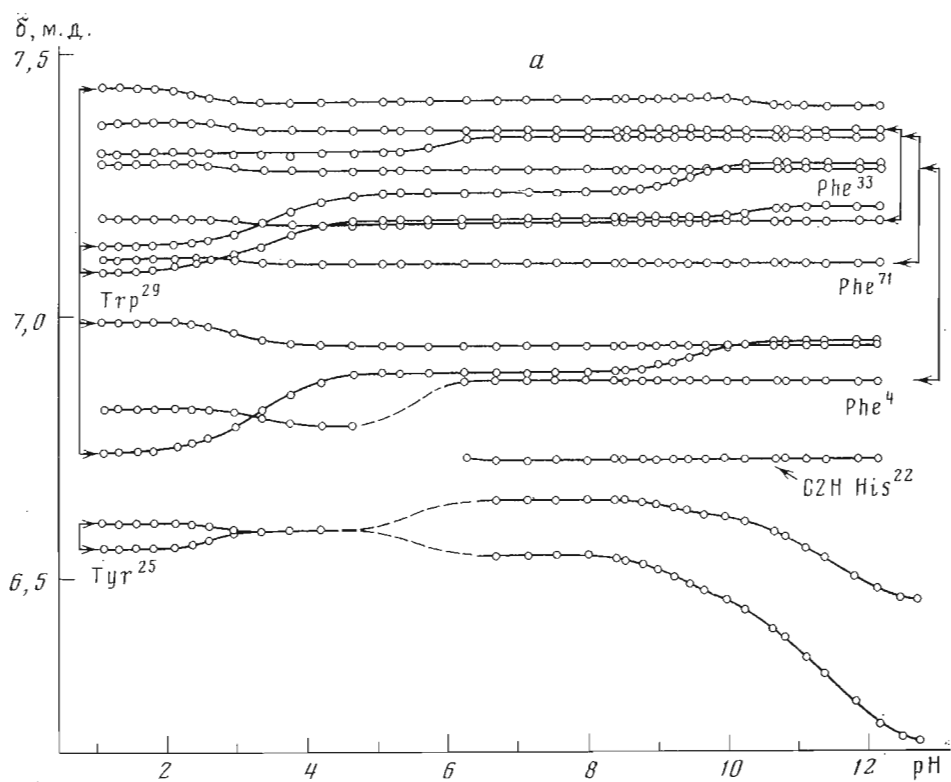


Рис. 6. pH-Зависимости химических сдвигов сигналов от ароматических протонов токсина S-T3 ($^2\text{H}_2\text{O}$, 32°C) (а) и его Lys²⁷(Ac)-производного (б). Пунктиром обозначены предполагаемые значения химических сдвигов в области pH, где сигналы были сильно уширены

ароматических протонов остатка Trp²⁹ в спектрах [Lys²⁷(Ac)]S-T3 отсутствуют перегибы при pH~9,5, обусловленные влиянием ε-аминогруппы остатка Lys²⁷ в нативном токсине (рис. 6). Кроме того, из сравнения pH-зависимости этих сигналов в спектрах [Lys⁵³(Ac)]S-T3 следует, что перегиб pK_a~10,7 обусловлен ε-аминогруппой остатка Lys⁵³.

Изменение состояния ионизации остатка His²² вызывает смещение сигналов C2,6-протонов остатка Phe⁴ и C3,5-протонов остатка Phe⁷¹ (рис. 6, табл. 2), при этом сигнал C2,6-Н Phe⁴ значительно уширяется в интервале pH 6,5—4,8 (32°С, 300 МГц). При понижении температуры можно наблюдать появление второго сигнала от этих протонов (рис. 4), что свидетельствует о медленном обмене между двумя конформационными состояниями с различным окружением остатка Phe⁴ в таком же интервале pH, как для рассмотренных выше остатков His²² и Tyr²⁵.

Кроме того, сигналы каждого из остатков Phe испытывают слабое влияние (Δδ~0,02—0,03 м.д.) ионизации карбоксильных групп в интервале pH 2,5—3,5, но не реагируют на депротонирование аминогрупп лизиновых и N-концевого остатков.

Отнесение сигналов C^εH₂-групп лизиновых остатков. Нейротоксин S-T3 содержит пять остатков лизина в положениях 15, 27, 39, 53 и 75 (рис. 1). Для отнесения сигналов от протонов C^εH₂-групп остатков Lys использована серия моноацетильных производных S-T3 по ε-аминогруппам указанных остатков.

На рис. 7 представлена область сигналов протонов C^εH₂ остатков Lys нативного S-T3 и трех его моноацетильных производных. В спектре нативного токсина хорошо разрешены три триплетных сигнала при 2,87, 2,93 и 2,95 м. д., отнесенные к протонам C^εH₂ остатков Lys на основании их характерной pH-зависимости (табл. 3). Ацетилирование ε-аминогруппы остатка Lys вызывает изменение химических сдвигов и магнитную неэквивалентность протонов C^εH₂. При этом в ¹H-ЯМР-спектре ацетильного производного сигналы протонов C^εH₂ образуют сложную спиновую систему и становятся трудными для наблюдения. Модификация ε-аминогрупп остатков Lys¹⁵, Lys⁵³ и Lys⁷⁵ приводит к исчезновению соответствующего триплетного сигнала (рис. 7), что позволяет однозначно отнести значение pK_a к определенной ε-аминогруппе в токсине S-T3 (табл. 3). Ацетилирование ε-аминогрупп остатков Lys²⁷ и Lys³⁹ не позволяет выделить их C^εH₂-сигналы в ¹H-ЯМР-спектрах. Ясно, что сигналы от протонов C^εH₂-групп этих лизиновых остатков проявляются в виде широкого мультиплета вследствие ограниченной подвижности боковых цепей остатков Lys²⁷ и Lys³⁹.

Трифторацетилированные производные. Благодаря высокой чувствительности химического сдвига фтора к изменению микроокружения спектроскопия ¹⁹F-ЯМР широко используется при конформационном анализе пептидов и белков [17, 33].

Для исследования локального окружения лизиновых остатков использована серия монотрифторацетильных (F₃Ac) производных токсина S-T3 по ε-аминогруппам остатков Lys^{15,27,39,53,75}, полученная реакцией с тиоэтиловым эфиром трифторуксусной кислоты. При разделении реакционной

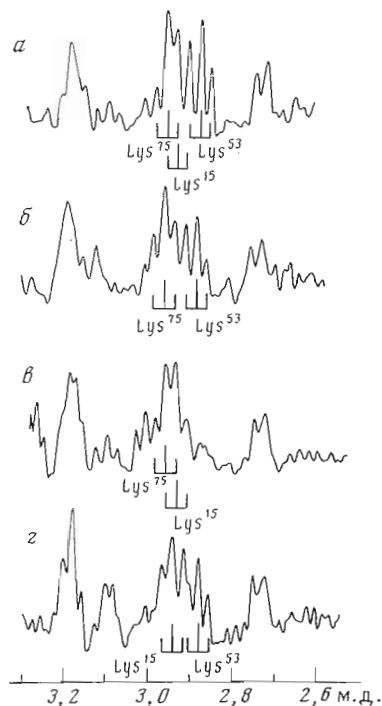


Рис. 7. ¹H-ЯМР-спектры (300 МГц, ²H₂O, 32°С, pH 7,5) токсина S-T3 (а) и его ацетильных производных по остаткам Lys¹⁵ (б), Lys⁵³ (в) и Lys⁷⁵ (г). Схематически показаны сигналы C^εH₂-протонов остатков лизина

Параметры, характеризующие зависимость химических сдвигов сигналов ^{19}F трифторацетильных и протонов ацетильных и C^{H}_2 -групп токсина 3 *N. n. siamensis* от pH ($2\text{H}_2\text{O}$, 32°C)

Остаток	Группа	δ , м. д. при pH 1	pK^1_a	$\Delta\delta_1$, м. д.	h_1	pK^2_a	$\Delta\delta_2$, м. д.	h_2	pK^3_a	$\Delta\delta_3$, м. д.	h_3
Lys ¹⁵	CF ₃ CO	1,79				5,52	-0,28	1,23			
Lys ²⁷	CF ₃ CO	1,25	2,6	0,09	0,98	~5,6	0,04				
Lys ³⁹	CF ₃ CO	1,78	3,5	-0,08	1,0						
Lys ⁵³	CF ₃ CO	1,67	~3,5	-0,04							
Lys ⁷⁵	CF ₃ CO	1,71	≤2,0	0,03							
Lys ²⁷	CH ₃ CO	1,44	2,9	0,17	0,87	~5,6	0,02		10,73	0,15	1,05
Lys ¹⁵	C ^e H ₂	2,95				~5,6	0,02		10,85	0,33	0,96
Lys ⁵³	C ^e H ₂	2,87							10,75	0,34	0,94
Lys ⁷⁵	C ^e H ₂	2,95							10,60	0,37	1,0

смеси на биорексе 70 получена хроматограмма, практически совпадающая с картиной разделения моноацетильных производных токсина S-T3 [34] (рис. 8). Такое полное совпадение позволяет считать, что в моно-F₃Ac-производных модифицированы те же остатки, что и в соответствующих моноацетильных производных, и восполняются идентификацией модифицированных остатков, выполненной для последних в работе [34]. Исключение составляет фракция 4 (рис. 8a), которая, очевидно, представляет собой смесь F₃Ac-производных по остаткам Lys³⁹ и Lys¹⁵. Для этой фракции в спектрах ^{19}F -ЯМР наблюдаются два сигнала. На основании сопоставления pH-зависимостей этих сигналов (табл. 3) с pH-зависимостью CH₃CO-групп в спектрах соответствующих моноацетильных производных каждый из сигналов ^{19}F отнесен к конкретному F₃Ac-аналогу токсина S-T3.

Результаты исследования pH-зависимости химического сдвига сигналов от CF₃CO-групп лизиновых остатков F₃Ac-производных токсина S-T3 приведены в табл. 3. Сигналы ^{19}F от остатков Lys¹⁵ и Lys²⁷ испытывают влияние изменения ионизационного состояния остатка His²² ($pK_a \sim 5,6$). Перегиб при pH 2,6 сигнала от Lys²⁷(F₃Ac) может быть обусловлен сближенностью боковой цепи этого остатка с карбоксильной группой остатка Asp³¹ или Asp⁴² [7]. При исследовании микроокружения остатка Tyr²³ (см. выше) было показано, что для [Lys²⁷(Ac)]S-T3 pK_a остатка Asp⁴² лежит в интервале pH 3–4. Следовательно, значение pK_a 2,6, проявляющееся на кривой pH-зависимости ^{19}F -сигнала от остатка Lys²⁷, обусловлено влиянием карбоксильной группы остатка Asp³¹, что хорошо согласуется с результатами рентгеноструктурного анализа [7]. Химические сдвиги ^{19}F для F₃Ac-производных по остаткам Lys³⁹ и Lys⁵³ испытывают влияние карбоксильных групп с $pK_a \sim 3,5$. Действительно, по данным рентгеноструктурного анализа [7], боковая цепь остатка Lys³⁹ токсина S-T3 пространственно сближена с карбоксильной группой Asp⁵⁸, а на Lys⁵³(F₃Ac) ее влияние передается, по-видимому, опосредованно. Аномально низкое значение pK_a ($\leq 2,0$), проявляющееся на кривой pH-зависимости ^{19}F -сигнала от Lys⁷⁵(F₃Ac), объясняется влиянием С-концевой карбоксильной группы, так как, по данным рентгеноструктурного анализа [7], С-концевой тетрапептид Arg⁷⁴-Lys⁷⁵-Arg⁷⁶-Pro⁷⁷ экспонирован в среду и боковая цепь остатка Lys⁷⁵ не может испытывать влияния других карбоксильных групп.

Из-за неустойчивости F₃Ac-производных при значениях pH > 8,0 исследование микроокружения остатков Lys в этом диапазоне pH было проведено по химическим сдвигам сигналов от протонов CH₃CO-групп Lys^{15,27,39,53,75} моноацетильных аналогов токсина S-T3. Химические сдвиги сигналов от ацетильных групп остатков Lys^{15,39,53,75} не меняются в диапазоне pH 7–12, что указывает на их удаленность от аминогрупп лизиновых остатков. Сигнал от CH₃CO-группы

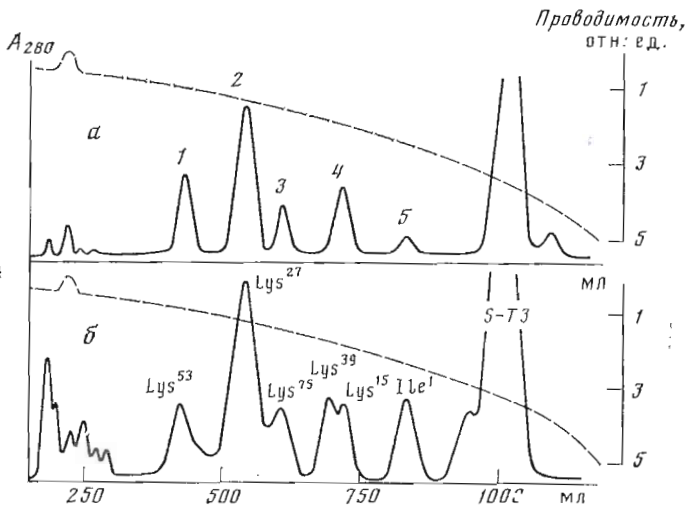


Рис. 8. Разделение моноацетилованных (а) производных токсина S-T3 на бюроксе 70 в градиенте концентраций аммоний-ацетатного буфера. б — разделение моноацетилованных производных токсина S-T3 по данным работы [34]. Пунктиром указано изменение электропроводности элюента, по которой определяли концентрацию соли в элюенте

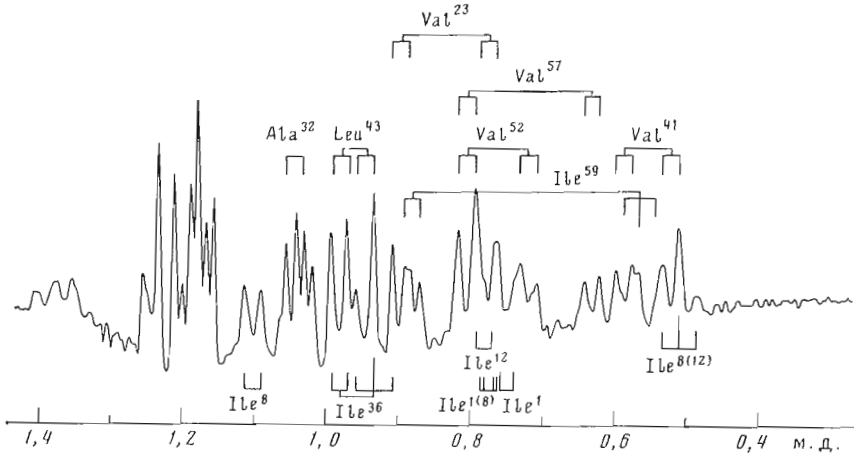


Рис. 9. Область сигналов метильных протонов $^1\text{H-NMR}$ (300 МГц) спектра токсина S-T3 ($^2\text{H}_2\text{O}$, pH 7,5; 32°C). Указано отнесение сигналов метильных протонов аминокислотных остатков

остатка Lys^{27} имеет сильную pH-зависимость с pK_a 10,7 (см. рис. 10б; табл. 3), что хорошо согласуется с данными рентгеноструктурного анализа [7] о сближенности боковых цепей остатков Lys^{27} и Lys^{53} .

Отнесение сигналов метильных протонов. Сочетание техники двойного резонанса и разностной спектроскопии дало возможность выделить в спектрах $^1\text{H-NMR}$ токсинов S-T3 и N-T3 сигналы от протонов всех метильных групп (за исключением одной из C^6H_3 -групп изолейцинового остатка) и отнести их к типам спиновых систем: пяти остаткам Val и Leu, пяти остаткам Ile, 12 остаткам Ala и Thr (в токсине N-T3 остаток Ala^{32} замещен на Gly^{32} , рис. 1). Прямое сравнение спектров областей сигналов метильных протонов токсинов S-T3 и N-T3, полученных при идентичных экспериментальных условиях (табл. 1), не позволило провести их отнесение, поскольку различия в первичной структуре (рис. 1) в положениях 32 и 53 вызывают смещение сигналов протонов пяти аминокислотных остатков. Данные рентгеноструктурного анализа [7] свидетельствуют о том, что замены остатков Lys^{53} на Arg^{53} и Ala^{32} на Gly^{32} могут влиять на химический сдвиг протонов $\text{Ile}^{36,59}$ и $\text{Val}^{152,57}$. Для отнесения выделенных сигна-

Параметры, характеризующие зависимость химических сдвигов сигналов метильных протонов токсина *S. n. stamensis* от pH ($^2\text{H}_2\text{O}$, 32°C)

Остаток	Протоны группы	δ_{H^+} , м. д.	pK_a^1	$\Delta\delta_1$, м. д.	pK_a^2	$\Delta\delta_2$, м. д.	pK_a^3	$\Delta\delta_3$, м. д.	pK_a^4	$\Delta\delta_4$, м. д.
Pe ¹	C ^γ H ₃	0,67	~3,2	0,02	*	-0,08	9,57	0,12		
Pe ¹⁽⁸⁾	C ^δ H ₃	0,75	~3,2	-0,02			~9,6	-0,02		
Pe ⁸	C ^γ H ₃	1,07	~3,3	-0,05	~5,6	0,02				
Pe ⁸⁽¹²⁾	C ^δ H ₃	0,60	3,52	0,07						
Pe ¹²	C ^γ H ₃	0,79	~3,3	0,02						
Pe ³⁶	C ^γ H ₃	0,94	~2,5	-0,04						
	C ^δ H ₃	0,88	~2,5	-0,05						
Pe ⁵⁹	C ^γ H ₃	0,90					~9,5	0,02		
	C ^δ H ₃	0,53	~3,2	-0,03	~5,6	-0,02	~9,5	0,02		
Val ²³	C ^{γ'} H ₃	0,89			~5,6	0,02				
	C ^{γ''} H ₃	0,71	~3,2	0,02	*	-0,09				
Val ⁴¹	C ^{γ'} H ₃	0,56	~3,3	-0,04	~5,6	0,02	~9,5	-0,02	~10,5	-0,04
	C ^{γ''} H ₃	0,51			~5,6	-0,02				
Val ⁵²	C ^{γ'} H ₃	0,77	~3,3	-0,02	~5,6	-0,03				
	C ^{γ''} H ₃	0,68	~3,3	-0,02	~5,6	-0,02				
Val ⁵⁷	C ^{γ'} H ₃	0,84	~2,5	-0,02	~3,5	0,03			10,32	0,13
	C ^{γ''} H ₃	0,64	~2,5	-0,02					10,10	0,14
Leu ⁴³	C ^{δ'} H ₃	0,95	~3,2	-0,03						
	C ^{δ''} H ₃	0,90	~3,2	-0,04						
Ala ³²	C ^β H ₃	1,18	2,52	0,14						

* Сигналы C^γH₃- и C^{γ''}H₃-протонов соответственно остатков Pe¹ и Val²³ не наблюдаются в спектрах в диапазоне значений pH 5–6.

лов к конкретным аминокислотным остаткам использовалась серия моноацетильных производных токсина S-T3. Отнесение (рис. 9) основывалось на данных рентгеноструктурного анализа токсина S-T3 [7] и сравнительном исследовании pH-зависимости химических сдвигов метильных сигналов нативного токсина S-T3 и его ацетильных производных по α-аминогруппе остатка Pe¹ и ε-аминогруппам остатков Lys²⁷ и Lys⁵³. Сравнительный анализ спектров нативного и шести моноацетильных производных токсина S-T3 проведен при pH 7,5, поскольку в диапазоне значений pH от 6,5 до 8,2 химические сдвиги сигналов метильных протонов постоянны. Изменения химического сдвига, вызываемые ацетилированием аминокрупп в молекуле, приведены в табл. 1.

[Lys²⁷(Ac)]S-T3. Из рис. 10 можно видеть, что ацетилирование ε-аминогруппы остатка Lys²⁷ устраняет перегибы при pH~9,5 на кривых pH-зависимости триплетного и дублетного сигналов (δ 0,56 и 0,88 м. д. соответственно) от метильных протонов изолейцинового остатка, вызывая изменение их химического сдвига (табл. 1). По данным рентгеноструктурного анализа токсина S-T3 [7], с боковой цепью остатка Lys²⁷ может быть пространственно сближен только один из остатков изолейцина — Pe⁵⁹. Модификация остатка Lys²⁷ сдвигает в сильное поле также два дублетных сигнала с δ 0,82 и 0,64 м. д. (рис. 9), отнесенных к C^γH₃-группам остатка Val⁵⁷ на основании следующих экспериментальных данных: 1) оба сигнала в спектре токсина S-T3 проявляют pH-зависимость химического сдвига с pK_a 10,3 и 10,1 и коэффициентами Хилла 0,79 и 0,69 соответственно (рис. 10, табл. 4), указывая на влияние по крайней мере двух ионогенных групп в интервале значений pH 8,2–12,0; 2) при ацетилировании остатка Lys²⁷ или Lys⁵³ на кривых pH-зависимостей химических сдвигов указанных метильных сигналов проявляется только одно значение pK_a в щелочной области pH — 10,7 для [Lys²⁷(Ac)]S-T3 (рис. 10б) и 9,46 для [Lys⁵³(Ac)]S-T3 с коэффициентами Хилла 1,0. Полученные результаты хорошо согласуются с результатами рентгеноструктурного анализа [7], свидетельствующими о пространственной сближенности боковых цепей остатков Val⁵⁷, Lys²⁷ и Lys⁵³.

[Lys⁵³(Ac)]S-T3. Ацетилирование ε-аминогруппы остатка Lys⁵³ изменяет химические сдвиги метильных протонов остатков Pe⁵⁹ и Val⁵⁷ и дуб-

летных сигналов с δ 0,81 и 0,72 м. д. (рис. 9, табл. 1), принадлежащих спиновой системе метильных протонов валинового или лейцинового остатка. Поскольку модификация других аминогрупп в токсине S-T3 не влияет на химический сдвиг данных метильных сигналов (табл. 1), а сигналы метильных протонов остатка Val⁵⁷ известны (рис. 9), два дублетных сигнала с δ 0,81 и 0,72 м. д. должны быть отнесены к протонам C¹H₃-групп остатка Val⁵², что хорошо согласуется с близким пространственным расположением боковых цепей остатков Lys⁵³ и Val⁵² токсина S-T3 в кристалле [7].

[Lys³⁹(Ac)]S-T3. Селективное ацетилирование ϵ -аминогруппы остатка Lys³⁹ вызывает смещение дублетного и триплетного сигналов с δ 0,98 и 0,92 м. д. соответственно (рис. 9, табл. 1), принадлежащих метильным протонам одного из изолейциновых остатков. Оба метильных сигнала проявляют сходную рН-зависимость химических сдвигов (рис. 10, табл. 4) с перегибом при рН~2,5, который указывает на влияние карбоксильной группы остатка Asp³¹, и изменяют химический сдвиг только при ацетилировании остатка Lys³⁹ (табл. 1). Данные рентгеноструктурного анализа токсина S-T3 [7] свидетельствуют о том, что из всех изолейциновых остатков только Ile³⁶ может быть пространственно сближен с боковыми цепями остатков Lys³⁹ и Asp³¹. Следовательно, метильные сигналы с δ 0,98 и 0,92 м. д. (рис. 9) можно отнести соответственно к C¹H₃- и C⁶H₃-протонам остатка Ile³⁶.

Анализ структуры токсина S-T3 в кристалле [7] указывает также на пространственную сближенность боковых цепей остатков Lys³⁹ и Val⁴¹. Поэтому сдвигающийся при модификации остатка Lys³⁹ сигнал с δ 0,58 м. д. отнесен к протонам одной из метильных групп остатка Val⁴¹ (рис. 9, табл. 1). Перегиб при рН~9,5 на кривой рН-зависимости этого метильного сигнала остатка Val⁴¹ обусловлен влиянием ϵ -аминогруппы остатка Lys²⁷ (рис. 10, табл. 4). Вероятно, этот эффект передается опосредованно, так как, по данным рентгеноструктурного анализа [7], боковые цепи остатков Lys²⁷ и Val⁴¹, находящиеся в β -структурном участке молекулы, направлены в противоположные стороны. Значение рK_a~10,5 на кривой рН-зависимости метильного сигнала остатка Val⁴¹ отнесено к ϵ -аминогруппе остатка Lys³⁹, поскольку модификации других аминогрупп (кроме ϵ -аминогруппы остатка Lys²⁷, табл. 1) в токсине S-T3 не влияют на химический сдвиг сигналов метильных протонов остатка Val⁴¹.

[Ile¹(Ac)]S-T3. При сравнении рН-зависимостей химических сдвигов метильных сигналов токсина S-T3 и его Lys²⁷(Ac)-производного видно, что помимо значения рK_a 9,46, принадлежащего ϵ -аминогруппе остатка Lys²⁷, в молекуле существует еще одна ионизирующая группа с близким значением рK_a 9,57, влияние которой наблюдается по химическим сдвигам C¹H₃- и C⁶H₃-сигналов изолейцинового остатка с δ 0,76 и 0,77 м. д. соответственно (рис. 9, 10, табл. 4). Так как значения рK_a ϵ -аминогрупп всех остатков лизина и ароматического кольца остатка Tyr²⁵ определены (табл. 2, 3), рK_a 9,57 было отнесено к α -аминогруппе остатка Ile¹. Модификация α -аминогруппы этого остатка вызывает изменение химического сдвига метильных протонов остатка изолейцина с δ 0,76 и 0,77 м. д. (рис. 9, табл. 1), что позволяет отнести дублетный сигнал к C¹H₃-протонам остатка Ile¹. Поскольку в разностных спектрах токсина S-T3 выделены сигналы только четырех из пяти C⁶H₃-групп изолейциновых остатков, сигнал с δ 0,77 м. д. нельзя однозначно отнести к C⁶H₃-протонам остатка Ile¹, так как модификация его α -аминогруппы может влиять также на химический сдвиг метильных протонов остатка Ile⁸ [7]. Сигнал от C¹H₃-группы остатка Ile¹ проявляет аномальную зависимость химического сдвига в интервале рН 4,8–6,5 (рис. 10), свидетельствуя о пространственной сближенности с боковой цепью остатка His²², что хорошо согласуется с данными рентгеноструктурного анализа [7].

Модификация α -аминогруппы остатка Ile¹ вызывает сдвиг дублетного сигнала с δ 0,89 м. д. (рис. 9, табл. 1), принадлежащего одной из метильных групп остатка Val²³ или Leu⁴³. Второй метильный сигнал данной спиновой системы (с δ 0,71 м. д., рис. 9) при изменении состояния иони-

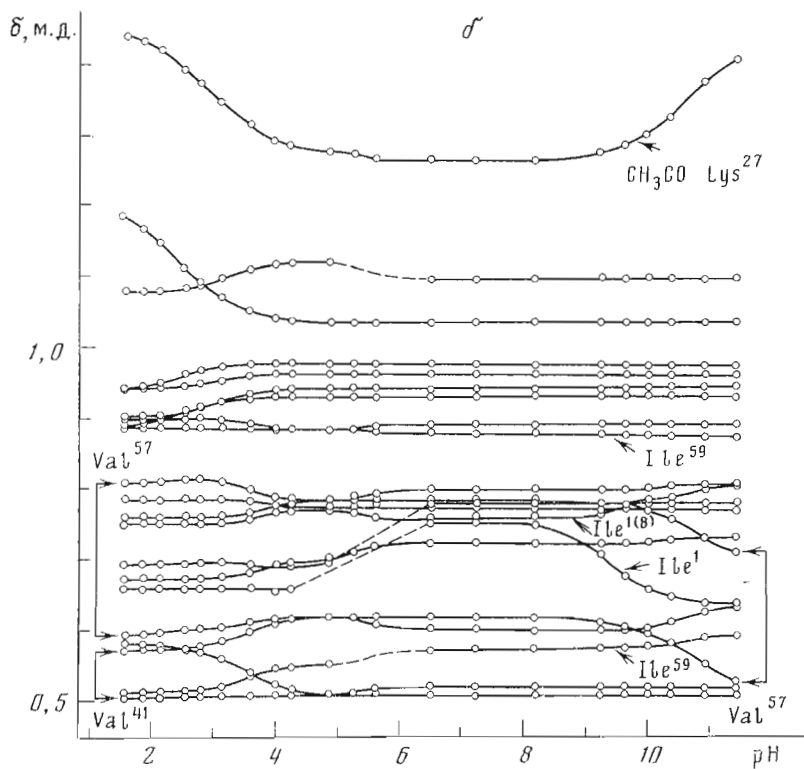
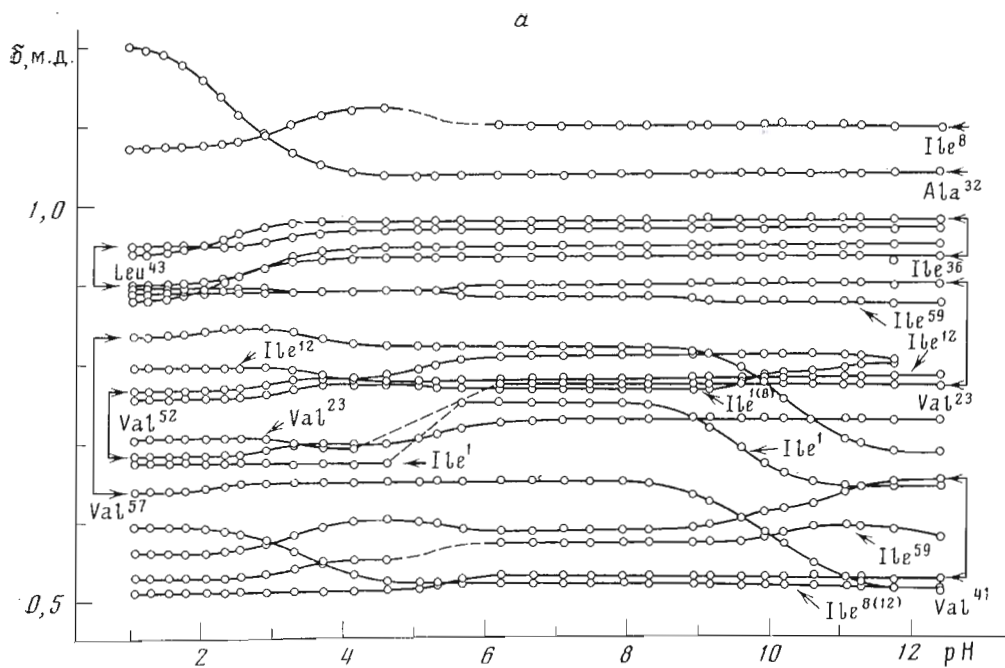
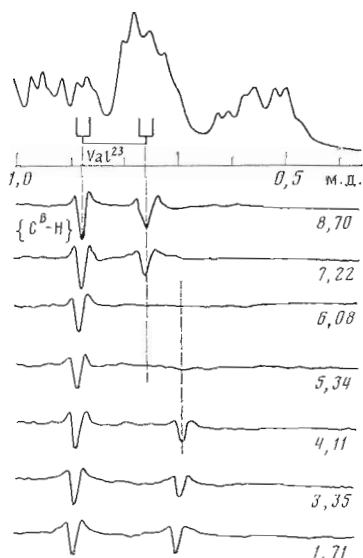


Рис. 10. pH-Зависимости химических сдвигов сигналов метильных протонов токсина S-T3 (*a*) и его $\text{Lys}^{27}(\text{Ac})$ -производного (*б*)

Рис. 11. Разностные ^1H -ЯМР-спектры токсина S-T3 ($^2\text{H}_2\text{O}$, 32°C , 300 МГц) при различных значениях pH (указаны цифрами справа), полученные при облучении резонансной частотой сигнала C^6H -протона остатка Val 23 . Вверху показан фрагмент метильной области спектра при pH 8,70



зации остатка His 22 проявляет аномальную pH-зависимость химического сдвига (рис. 10, 11), подобную зависимости сигнала C^1H_3 остатка Ile 1 . По данным работы [7], в кристалле боковая цепь остатка Val 23 обличена с остатками His 22 и Ile 1 , поэтому дублетные сигналы с δ 0,89 и 0,71 м. д. (рис. 9) отнесены к протонам C^1H_3 остатка Val 23 .

[Lys 15 (Ac)]S-T3. Ацетилирование ϵ -аминогруппы остатка Lys 15 влияет на химический сдвиг сигнала от протонов C^1H_3 с δ 0,77 м. д., отнесенного при исследовании спектров [Ile 1 (Ac)]S-T3 к остатку Ile 1 или Ile 8 , и сигнала C^1H_3 -группы с δ 1,1 м. д. (рис. 9, табл. 1), который, по данным рентгеноструктурного анализа [7], может принадлежать метильным протонам остатка Ile 8 .

[Lys 75 (Ac)]S-T3. Ацетилирование ϵ -аминогруппы остатка Lys 75 не влияет на химические сдвиги сигналов метильных протонов остатков валина, изолейцина и Leu 43 .

Так как метильные сигналы четырех валиновых остатков (Val 23 , 41 , 52 , 57) уже отнесены в спектре токсина S-T3, оставшаяся пара дублетных сигналов с δ 0,97 и 0,93 м. д. может принадлежать только C^6H_3 -группам остатка Leu 43 (рис. 9). Ни одна из модификаций аминогрупп в молекуле не влияет на химический сдвиг сигналов от метильных протонов остатка Leu 43 , что соответствует данным рентгеноструктурного анализа токсина S-T3 [7], которые свидетельствуют об удаленности боковой цепи остатка Leu 43 от N-концевого и лизиновых остатков.

Дублетный сигнал с δ 0,79 м. д. (рис. 9) можно отнести к C^1H_3 -протонам остатка Ile 12 , поскольку остальные сигналы от четырех C^1H_3 -групп отнесены к остаткам Ile 1 , 8 , 36 , 59 . Триплетный сигнал C^6H_3 -протонов (δ 0,51 м. д., рис. 9), не изменяющий свой химический сдвиг при модификации каждой из аминогрупп в молекуле S-T3, может принадлежать остатку Ile 8 или Ile 12 .

Таким образом, сравнительное исследование серии моноацетильных производных S-T3 по α -аминогруппе Ile 1 и ϵ -аминогруппам Lys 15 , 27 , 39 , 53 , 75 позволило отнести все выделенные в спектре ^1H -ЯМР сигналы от ароматических протонов остатков Phe 4 и Phe 71 , метильные сигналы остатков валина, изолейцина и Leu 43 , а также определить значения pK_a всех аминогрупп в молекуле токсина S-T3. Сравнение внутримолекулярных контактов аминогрупп N-концевого и лизиновых остатков с ароматическими и метильными группами при pH 7,5 мы проводили со структурой молекулы для кристалла, полученного из раствора при pH 2,8 [7]. Несмотря на наблюдающийся pH-зависимый конформационный переход, данные ЯМР-исследования свидетельствуют о большом сходстве кристаллической структуры и конформации токсина в физиологической области значений pH

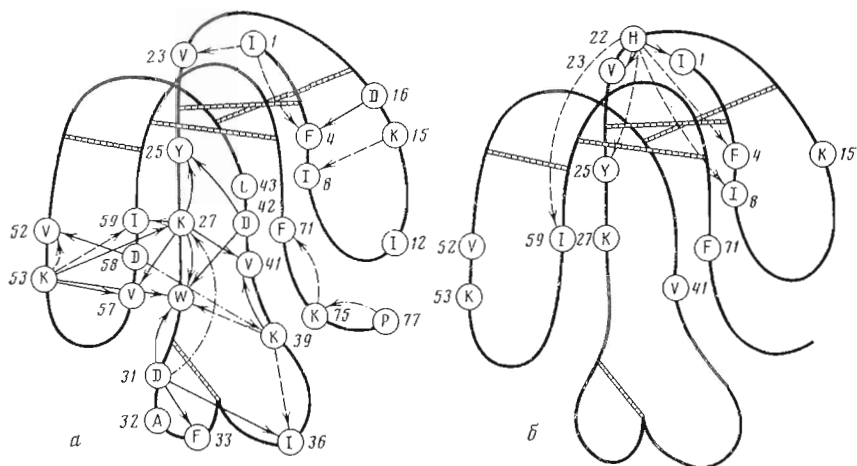


Рис. 12. Схема укладки основной цепи молекулы токсина 3 *N. n. siamensis* по данным рентгеноструктурного анализа [7]. *a* — линиями обозначены внутримолекулярные контакты по данным ЯМР: сплошные линии указывают влияние неполярной группы, пунктирные — влияние ацетилирования аминокруппы, штрихпунктирные — контакты трифторацетильных групп; *б* — сплошными линиями отмечены остатки, проявляющие большую разницу в химических сдвигах для двух конформационных состояний. Пунктирные линии указывают остатки, сигналы которых незначительно различаются по химическим сдвигам в двух состояниях. Сигналы с перегибом на кривых рН-зависимости при рН 5,6 принадлежат остаткам, не отмеченным стрелками (остаток Lys⁵³ изменяет ориентацию боковой цепи в интервале рН 4–7)

(рис. 12). Отнесение сигналов в области спектра метильных протонов токсина S-T3 хорошо объясняет влияние замен Lys⁵³/Arg⁵³ и Ala³²/Gly³² на химический сдвиг метильных протонов токсина N-T3 (табл. 1) и согласуется с данными рентгеноструктурного анализа [7]. Сравнение результатов рН-зависимости химических сдвигов метильных протонов токсинов S-T3 и N-T3 позволило отнести сигнал от C⁶H₃-группы остатка Ala³² (рис. 9). Данный сигнал проявляет сильную рН-зависимость химического сдвига с рK_a 2,50, указывая на влияние карбоксильной группы остатка Asp³¹ (рис. 10, табл. 4).

Полученное отнесение сигналов в метильной области ¹H-ЯМР-спектра токсина S-T3 совпадает с данными работы [27], где отнесение выполнено методом ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) только для протонов C¹H₃ остатка Val⁵⁷ и C⁶H₃-группы Ile⁵⁹. Здесь возможны два объяснения несоответствия в отнесении метильных сигналов: 1) облучение сильно перекрытых метильных областей, в которых расположено неизвестное количество сигналов, приводит к неоднозначности отнесения методом ЯЭО; 2) слишком большое время преднасыщающего импульса (0,5 с), использованное авторами работы [27], могло вызвать эффекты спиновой диффузии [35, 36], которые также приводят к неоднозначности отнесения сигналов.

Спин-меченые производные токсина 3 N.n. siamensis. Важную информацию о пространственной структуре белковой молекулы можно получить методами ¹H-ЯМР и ЭПР при исследовании селективно спин-меченых производных. Возможности такого подхода были продемонстрированы в случае спин-меченых производных короткого нейротоксина II *N.n. oxiana* [37, 38].

Спин-меченые производные токсина S-T3 были получены реакцией с N-оксисукцинимидным эфиром 2,2,6,6-тетраметил-4-карбоксиметилпиперидин-1-оксида. Использование 1,1, эквивалента реагента на 1 моль токсина приводит к образованию пяти диспин-меченых производных и лишь одного моноспин-меченого (рис. 13). Проведение реакции в денатурирующих условиях (6 М хлорид гуанидиния) не дает увеличения числа моноспин-меченых аналогов токсина S-T3. Результаты локализации (табл. 5) свидетельствуют, что моноспин-меченое производное содержит метку на остатке Lys²⁷. По-видимому, причина столь высокой реакционной способности остатка Lys²⁷ — отмеченное выше заниженное значение рK_a его ампрогруппы. Так как в результате реакции образуется только одно моно-

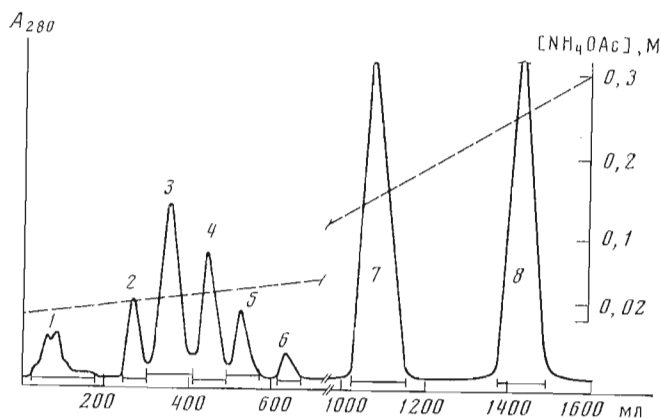


Рис. 13. Разделение спин-меченых производных токсина S-T3 на колонке с биорексом 70 (2×30 см) в градиенте молярности аммоний-ацетатного буфера, pH 7,0. Фракции 1–6 – диспин-меченые производные S-T3, 7 – моноспин-меченый; 8 – нативный токсин

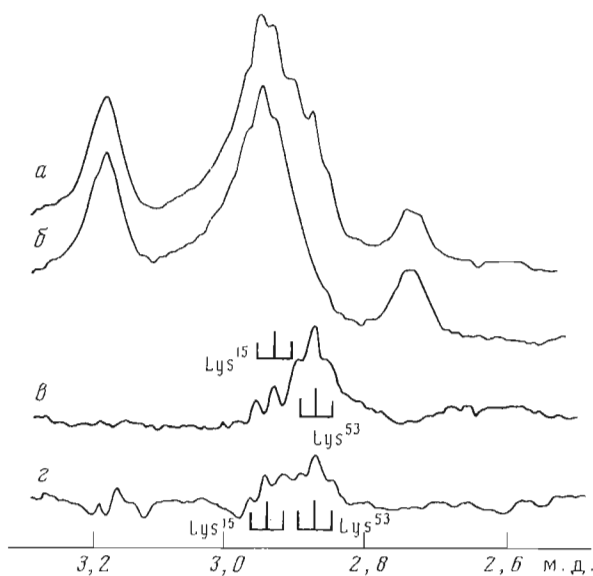


Рис. 14. ^1H -ЯМР-спектр (300 МГц) токсина S-T3 (а) и его спин-меченного по Lys^{27} производного (б) ($^2\text{H}_2\text{O}$, 32°C , pH 7,5), разностный спектр (в) и разностный спектр, полученный вычитанием спектров S-T3 при pH 3,5 (д). Отмечены сигналы протонов $\text{C}^{\alpha}\text{H}_2$ -групп остатков лизина

спин-меченое производное по остатку Lys^{27} , естественно предположить, что и во всех пяти диспин-меченых производных одним из модифицированных остатков является Lys^{27} . Очевидно, различием в микроокружении остальных остатков лизина объясняются различные выходы диспин-меченых производных. Из-за того что фракции 5 и 6 (рис. 13) были получены с незначительным выходом, локализация меток была проведена только для фракций 2–4 (рис. 13, табл. 5). Поскольку модифицированные производные токсина S-T3 по α -аминогруппе остатка Phe^1 элюируются последними (рис. 8), сделано предположение, что фракция 6 также содержит спин-меченый N-концевой остаток. Следовательно, фракция 5 должна содержать иминосильные радикалы на остатках Lys^{27} и Lys^{15} .

Для оценки конформационных изменений в молекуле токсина S-T3 исследовано влияние pH на степень уширения сигналов спиновой меткой в спектрах ^1H -ЯМР моноспин-меченного по ϵ -аминогруппе остатка Lys^{27} производного токсина S-T3. В интервале pH 1,9–8,0 наиболее сильно уширены сигналы от ароматических протонов остатков Tyr^{25} и Trp^{29} , C^1H_3 -

Локализация спиновых меток в производных токсина 3 *N. n. siamensis*, модифицированных по остаткам лизинов

Номер фракции (рис. 13)	Спин-меченые пептиды	Положение метки	Метод локализации
7	16-37	Lys ²⁷	ВЭЖХ
2	16-37	Lys ²⁷	
	63-77	Lys ⁷⁵	»
3	16-37	Lys ²⁷	»
	40-74	Lys ⁵³	
4	16-37	Lys ²⁷	
	38-40	Lys ³⁹	Гель-фильтрация
5	—	Lys ²⁷	По аналогии с работой [34]
		Lys ¹⁵	
6	—	Lys ²⁷	
		Pe ¹	»

группы Val⁵⁷ и протонов C¹³H₂ Pe⁵⁹, что хорошо согласуется с данными рентгеноструктурного анализа [7] и полученными в настоящей работе сведениями о пространственной сближенности боковых цепей Lys²⁷ и перечисленных аминокислотных остатков. Кроме того, наблюдается уширение сигнала от протонов C¹³H₂-группы остатка Lys⁵³, которое зависит от изменения состояния ионизации His²². О степени уширения сигналов можно судить по разностным спектрам, полученным вычитанием сигналов спин-меченного по остатку Lys²⁷ производного токсина S-T3 из спектра нативного токсина при значениях pH 7,5 и 3,5 (рис. 14). При pH 7,5 сигнал протонов C¹³H₂ остатка Lys⁵³ значительно уширен, о чем свидетельствует форма линии триплетного сигнала этих протонов в разностном спектре. При pH 3,5 сигнал протонов C¹³H₂ остатка Lys⁵³ уширен в меньшей степени, что проявляется в снижении его интенсивности в разностном спектре по сравнению с интенсивностью при pH 7,5. Это свидетельствует об изменении расстояния между боковыми цепями остатков Lys²⁷ и Lys⁵³. Уширение сигналов протонов C¹³H₂ остатка Lys¹⁵ (рис. 14) не зависит от pH среды, указывая на сохранение ориентации боковой цепи остатка Lys²⁷ в пространстве. Полученные данные предполагают переориентацию боковой цепи остатка Lys⁵³ в зависимости от состояния ионизации His²².

Для измерения расстояния между боковыми цепями остатков Lys²⁷ и Lys⁵³ был использован диспип-меченный по ε-аминогруппам указанных лизиновых остатков аналог S-T3. Анализ параметров ЭПР спектров диспип-меченого производного при -196°С показал (см. «Экспериментальную часть»), что при pH 7,5 и 3,5 расстояния между метками равны 18 и 23 Å соответственно.

Расстояния между иминоксильными радикалами в диспип-меченых производных токсина S-T3 по ε-аминогруппам остатков Lys²⁷-Lys¹⁵, Lys²⁷-Lys³⁹ и Lys²⁷-Lys⁷⁵, измеренные при pH 7,5 и температуре -196°С, превышают значения, которые могут быть определены методом двойных меток (≥30 Å).

Конформационные особенности токсина 3 N. n. siamensis. Ионизация остатка His²² изменяет микроокружение ряда остатков в молекуле токсина S-T3 (рис. 12б). Особо отметим следующие основные эффекты, проявляющиеся в спектрах ЯМР при 32°С:

1) ионизация остатка His²² вызывает изменения химических сдвигов протонов C2,4-H остатка His²², C¹³H₂ остатка Pe¹ и C¹³H₂ остатка Val²³, сопровождающиеся уширением, расщеплением и перераспределением интенсивности сигналов в диапазоне pH 5-6. Сигналы от других протонов данного остатка при этом могут оставаться узкими, как, например, сигнал от протонов C¹³H₂ остатка Val²³ с δ 0,89 м.д. (рис. 11). Это объясняется большой разницей в химических сдвигах сигнала протонов C¹³H₂ в двух конформационных состояниях молекулы S-T3 и относительно малой для C¹³H₂;

2) изменение химического сдвига сигналов от ароматических протонов

остатков Phe⁴ и Tyr²⁵, C¹H₃ остатка Pe⁸ и C⁶H₃ остатка Pe⁵⁹ сопровождается их сильным уширением в диапазоне рН 4,5–6,5;

3) сигналы протонов C⁶H₃ остатка Pe¹⁽⁸⁾, C¹H₃ остатка Val²³, (C¹H₃)₂ остатков Val⁴⁴ и Val⁵² C^εH₂ остатка Lys¹⁵, C3,5-H остатка Phe⁷¹ и сигналы ¹⁹F группы CF₃CO остатков Lys^{15, 27} имеют перегиб на кривых рН-зависимости химического сдвига при рН~5,6, но не изменяют свою полуширину при изменении состояния ионизации остатка His²². В данном случае химические сдвиги для двух конформационных состояний различаются недостаточно сильно, чтобы мог проявляться эффект уширения;

4) ионизация остатка His²² вызывает изменение расстояния между боковыми цепями остатков Lys²⁷ и Lys⁵³, являющихся функционально важными, так как они участвуют в связывании с ацетилхолиновым рецептором.

Эти особенности отражают обменный процесс между двумя конформационными состояниями токсина S-T3, причем можно условно выделить три локальные области в молекуле нейротоксина, затрагиваемые изменением состояния ионизации остатка His²² (рис. 12б). Наиболее сильному эффекту подвержены сигналы остатков, пространственно сближенных с остатком His²² и прилегающих к дисульфидным мостикам. Более удаленные остатки (находящиеся на концах трех петель) никакого влияния процессов протонирования и депротонирования имидазольного кольца остатка His²² не испытывают.

Необходимо отметить, что модификация аминогрупп не влияет на конформационный переход в молекуле моноацетильных производных токсина S-T3, так как характер уширения сигналов и диапазон значений рН, в котором наблюдаются перечисленные выше эффекты изменения состояния ионизации остатка His²², аналогичны описанным для нативного нейротоксина.

Таким образом, пространственное строение молекулы нейротоксина S-T3 в растворе, в целом согласующееся с найденным в кристалле методом рентгеноструктурного анализа [7] (рис. 12а), испытывает в области физиологических значений рН локальную конформационную перестройку, которая может иметь значение для особенностей кинетики связывания длинных нейротоксинов змей с ацетилхолиновым рецептором по сравнению с короткими нейротоксинами, в которых подобной перестройки не обнаружено [14–19].

Экспериментальная часть

Синтез монотрифторацетильных производных токсина 3 N.n. siamensis. К раствору 91 мг (11,2 мкмоль) токсина S-T3 в 2 мл 0,1 М N-этилморфолин-ацетатного буфера (рН 8,0) добавляли раствор 2,9 мкл (32,4 мкмоль) тиоэтилового эфира трифторуксусной кислоты в диметилформамиде. Перемешивали 1,5 ч при комнатной температуре, затем реакционную смесь обессоливали на сефадексе G-25 в 0,02 М ацетате аммония и хроматографировали на биорексе 70 в условиях, описанных в работе [34] (рис. 8).

Спин-меченые производные токсина 3 N.n. siamensis. К раствору 120 мг (15 мкмоль) токсина S-T3 в 5 мл N-этилморфолин-ацетатного буфера (рН 8,0) добавляли раствор 5 мг (16 мкмоль) N-оксисуццинимидного эфира 2,2,6,6-тетраметил-4-карбоксиметилпиперидин-1-оксида в 1 мл тетрагидрофурана. Смесь перемешивали 20 ч при 20°С, обессоливали на колонке с сефадексом G-25, уравновешенным 0,1 М уксусной кислотой, лиофилизировали белковую фракцию и разделяли на катионообменнике с биорексом 70 (рис. 13). Для локализации меток спин-меченые производные восстанавливали, карбоксиметилировали и подвергали триптическому гидролизу в условиях, описанных в работе [37]. Полученные пептиды (табл. 5) разделяли с помощью ВЭЖХ на хроматографе μ Bondapak C18 (Waters Associates) (фр. 2,3 и 7, рис. 13) или гель-фильтрации на сефадексе G-25sf [37] (фр. 4, рис. 13). Наличие спиновой метки в пептидах определяли методом ЭПР. Структуру меченых пептидов устанавливали на основании известной аминокислотной последовательности, аминокислотного и N-концевого анализов и путем сравнения с локализацией ацетильных групп в модифицированном токсине S-T3, описанной в работе [34].

Спектры ^1H -ЯМР растворов токсинов S-T3 и N-T3 в $^2\text{H}_2\text{O}$ и H_2O сняты на спектрометрах типа SC-300 (Varian) и WM-500 (Bruker) с рабочими частотами 300 и 500 МГц соответственно. ^{19}F -ЯМР-спектры монотрифтор-ацетильных производных токсина S-T3 получены при 94,2 МГц на спектрометре XL-100-15 (Varian). Химические сдвиги сигналов в ^1H -ЯМР-спектрах измерены относительно внутреннего стандарта натриевой соли 2,2-диметил-2-силапента-5-сульфоната и относительно внешнего стандарта — трифторуксусной кислоты для сигналов ^{19}F с точностью $\pm 0,005$ м.д.

Для измерения pH водных растворов нейротоксинов использовали pH-метр типа Orion Research 601 с комбинированным электродом Ingold 405 МЗ. Поправку на изотопный эффект в растворах $^2\text{H}_2\text{O}$ не вводили. Для изменения pH растворов нейротоксинов использовали 0,5 н. растворы KOH и ^2HCl . Спектры ^1H - и ^{19}F -ЯМР растворов нейротоксинов снимали в 5-мм ампуле.

Зависимость химических сдвигов сигналов ^1H и ^{19}F от pH среды согласовывали на ЭВМ по методу наименьших квадратов с теоретическим уравнением

$$\delta_{\text{набл}} = \delta_{\text{H}^+} - \Delta \delta \frac{10^{h(\text{pH}-\text{p}K_a)}}{1 + 10^{h(\text{pH}-\text{p}K_a)}}, \quad (1)$$

где $\delta_{\text{набл}}$ и δ_{H^+} — химические сдвиги сигнала, наблюдаемые при данном значении pH и при протонировании ионогенной группы соответственно; K_a — константа диссоциации ионогенной группы; $\Delta \delta$ — изменение химического сдвига при депротонировании ионогенной группы, h — коэффициент Хилла.

Зависимость интегральной интенсивности компонентов А и Б протона С2-Н His²² от pH также согласовывали на ЭВМ (см. ур-ние 1), однако вместо значений химических сдвигов сигналов и их изменений были использованы значения относительных интегральных интенсивностей.

Спектры ЭПР диспин-меченых производных по ϵ -аминогруппам остатков лизина в 0,1 М аммоний-ацетатном буфере снимали на спектрометре Varian E-109, оснащенный системой накопления E-900. Расстояние r (Å) между спиновыми метками в серии диспин-меченых производных рассчитывали по формуле [39]:

$$r = 9,3 + \frac{0,77}{\Delta}, \quad (2)$$

где Δ — экспериментальный параметр, рассчитываемый из ЭПР-спектра по методу, описанному в работе [39]. Значения Δ равны соответственно 0,060 и 0,085 при pH 3,5 и 7,5 для диспин-меченого производного токсина S-T3 по ϵ -аминогруппам Lys²⁷—Lys⁵³.

Спектры КД получены на дихрографе Jobin Ivon III при 22° С.

Авторы выражают благодарность В. И. Вахниной и Е. И. Подрезовой за съемку спектров кругового дихроизма нативного токсина 3 *Naja n. siamensis* и его ацетильных производных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yang C. C. *Toxicon*, 1974, v. 12, № 1, p. 1—43.
2. Tu A. T. In: *Venoms: chemistry and molecular biology*. A Wiley-interscience publication, J. Wiley and Sons, 1977, chap. 18, p. 257—300.
3. Karlsson E. In: *Snake venoms. Handbook of Exp. Pharmacol*/Ed. Lee C.-Y. Berlin: Springer Verlag, 1979, v. 52, chap. 5, p. 159—212.
4. Dufton M. J., Hider R. C. *CRC Critical Rev. Biochem.*, 1983, v. 14, № 2, p. 113—171.
5. Tanaka S., Sheraga H. A. *Macromolecules*, 1977, v. 10, № 2, p. 305—316.
6. Menez A., Langlet G., Tamiya N., Fromageot P. *Biochimie*, 1978, v. 60, № 5, p. 505—516.
7. Walkinshaw M. D., Saenger W., Maelicke A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1980, v. 77, № 5, p. 2400—2404.
8. Stroud R. M. In: *Biomolecular stereodynamics*/Ed. Sarma R. H. N. Y.: Adenine Press, 1981, v. 2, p. 55—73.
9. Kistler J., Stroud R. M., Klymkowsky M. W., Lalancette R. A., Fairclough R. H. *Biophys. J.*, 1981, v. 37, № 1, p. 371—383.

10. Tsernoglou D., Petsko G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 3, p. 971-974.
11. Kimball M. R., Sato A., Richardson J. S., Rosen L. S., Low B. W. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1979, v. 88, № 3, p. 950-959.
12. Low B. W. In: Snake venoms. Handbook of Exp. Pharmacol/Ed. Lee C.-Y. Berlin: Springer Verlag, 1979, v. 52, chap. 6, p. 213-257.
13. Chicheportiche K., Vincent J. P., Kopeyan C., Schweitz H., Lazdunski M. Biochemistry, 1975, v. 14, № 10, p. 2081-2091.
14. Arseniev A. S., Balashova T. A., Utkin Yu. N., Tsetlin V. I., Bystrov V. F., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. Eur. J. Biochem., 1976, v. 71, № 2, p. 595-606.
15. Lauterwein J., Lazdunski M., Wuthrich K. Eur. J. Biochem., 1978, v. 92, № 2, p. 361-371.
16. Arseniev A. S., Pashkov V. S., Pluzhnikov K. A., Rochat H., Bystrov V. F. Eur. J. Biochem., 1981, v. 118, № 2, p. 453-462.
17. Tsetlin V. I., Arseniev A. S., Utkin Yu. N., Gurevich A. Z., Senyavina L. B., Bystrov V. F., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. Eur. J. Biochem., 1979, v. 94, № 2, p. 337-346.
18. Takamatsu R., Harada I., Hayashi K. Biochim. et biophys. acta, 1980, v. 622, № 2, p. 189-200.
19. Inagaki F., Tamiya N., Miyazawa T., Williams R. J. P. Eur. J. Biochem., 1981, v. 118, № 3, p. 621-625.
20. Bystrov V. F. In: Biomolecular structure, conformation, function and evolution/Eds Srinivasan R., Yathindra N., Subramanian E. Oxford: Pergamon Press, 1981, v. 2, p. 3-21.
21. Tsetlin V. I., Karlsson E., Arseniev A. S., Utkin Yu. N., Surin A. M., Pashkov V. S., Pluzhnikov K. A., Ivanov V. T., Bystrov V. F., Ovchinnikov Yu. A. FEBS Lett., 1979, v. 106, № 1, p. 47-52.
22. Ivanov V. T., Tsetlin V. I., Karlsson E., Arseniev A. S., Utkin Yu. N., Pashkov V. S., Surin A. M., Pluzhnikov K. A., Bystrov V. F. In: Natural toxins/Eds. Eaker D., Wadstrom T. Oxford, New York: Pergamon Press, 1980, p. 523-530.
23. Karlsson E., Eaker D., Ponterius G. Biochim. et biophys. acta, 1972, v. 257, № 2, p. 235-248.
24. Nakai K., Sasaki T., Hayashi K. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1971, v. 44, № 4, p. 893-897.
25. Tsetlin V. I., Karlsson E., Utkin Yu. N., Pluzhnikov K. A., Arseniev A. S., Surin A. M., Kondakov V. I., Bystrov V. F., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. Toxicol., 1982, v. 20, № 1, p. 83-93.
26. Kondakov V. I., Arseniev A. S., Pluzhnikov K. A., Tsetlin V. I., Bystrov V. F. Abstracts of VIth Bilateral symposium USSR - France «Structure and function of proteins and nucleic acids». Tskhaltubo, 1982, p. 111.
27. Hider R. C., Drake A. F., Inagaki F., Williams R. J. P., Endo T., Miyazawa T. J. Mol. Biol., 1982, v. 158, № 2, p. 275-291.
28. Кондаков В. И., Плужникова К. А., Цетлин В. И., Быстров В. Ф. Тез. V Всес. симпозиума по химии и физике белков и пептидов. Баку, 1980, с. 74.
29. Markley J. L. Acc. Chem. Res., 1975, v. 8, № 2, p. 70-80.
30. Takonura M., Tasumi M., Miyazawa T. Biopolymers, 1976, v. 15, № 2, p. 393-401.
31. Endo T., Inagaki F., Hayashi K., Miyazawa T. Eur. J. Biochem., 1982, v. 122, № 2, p. 541-547.
32. Endo T., Inagaki F., Hayashi K., Miyazawa T. Eur. J. Biochem., 1981, v. 120, № 1, p. 117-124.
33. Sykes B. D., Hull W. E. In: Methods in enzymology/Eds Hirs C. H. W., Timasheff S. N. N. Y.: Pergamon Press, 1978, v. 49, pt G, p. 270-295.
34. Balasubramaniam K., Eaker D., Karlsson E. Toxicol., 1983, v. 21, № 2, p. 219-229.
35. Dubs A., Wagner G., Wuthrich K. Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 577, № 1, p. 177-194.
36. Kumar A., Wagner G., Ernst R. R., Wuthrich K. J. Amer. Chem. Soc., 1981, v. 103, № 13, p. 3654-3658.
37. Уткин Ю. Н., Пашков В. С., Плужников К. А., Курятов А. Б., Арсеньев А. С., Цетлин В. И., Быстров В. Ф., Иванов В. Т. Биооргани. химия, 1983, т. 9, № 4, с. 437-449.
38. Пашков В. С., Арсеньев А. С., Уткин Ю. Н., Цетлин В. И., Быстров В. Ф. Биооргани. химия, 1982, т. 8, № 5, с. 588-615.
39. Пармон В. Н., Кокорин А. И., Жидомиров Г. М. В кн.: Стабильные бирадикалы. М.: Наука, 1980, с. 125-131.

Поступила в редакцию
22.XII.1983

NMR STUDY OF TOXIN 3 *NAJA NAJA SIAMENSIS* SPATIAL STRUCTURE

KONDAKOV V. I., ARSENIYEV A. S., UTKIN Yu. N., KARLSSON E*.,
GUREVICH A. Z., TSETLIN V. I., BYSTROV V. F., IVANOV V. T.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow; * Institute of Biochemistry, Uppsala*

The 300 and 500 MHz ^1H NMR spectra of a long-chain neurotoxin, toxin 3 *Naja naja siamensis* (S-T3), its derivatives and close homolog, toxin 3 *Naja naja naja* (N-T3), have been analyzed. A combination of double resonance, difference spectroscopy and usage of a series of toxin S-T3 derivatives acetylated or trifluoroacetylated at lysine residues allowed to assign the signals from all aromatic protons and a number of signals in the aliphatic region, and to elucidate the microenvironment of certain functionally important residues. Analysis of chemical shifts pH-dependences in the ^1H and ^{19}F NMR spectra of toxin S-T3 and its trifluoroacetylated congeners delineated a considerable region of the neurotoxin molecule affected by the conformational transition, with the midpoint at pH 5.4, between two states. This conformational transition is induced by protonation of His²² and is accompanied by a change in the accessibility of its imidazole ring for the solvent, along with the alteration of the distance between the side chains of functionally important Lys²⁷ and Lys⁵³ residues. According to EPR data (-196°) for the respective S-T3 derivative having spin labels at Lys²⁷ and Lys⁵³ ϵ -amino groups, the inter-label distance increases from 18 Å at pH 7.5 to 23 Å at pH 3.5. Notwithstanding this conformational change, the totality of the obtained results evidences in favor of considerable similarity of the toxin S-T3 spatial structure in the solution and crystalline state.