



## ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.322.5 : 541.69 : 543.42.25

### ВКЛАД СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР В ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СООТНОШЕНИЙ БЕЛКОВО-ПЕПТИДНЫХ ВЕЩЕСТВ

*Быстров В. Ф.*

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

Спектроскопия ЯМР предоставляет уникальные возможности для изучения молекулярной конформации, механизма действия и структурно-функциональных соотношений для пептидов и белков в растворах при условиях, приближенных к физиологическим. Развитие методики ЯМР, специально предназначенной для конформационного анализа пептидно-белковых молекул, рассмотрено в плане двухуровневого отнесения сигналов и структурной значимости гомо- и гетероядерных спин-спиновых констант взаимодействия. Результаты конформационного ЯМР-анализа представлены для антибиотиков валиномицина и грамицидина А, нейротоксина из яда медоносной пчелы — апамина, скорпионового инсектотоксина I<sub>5</sub>A и выделенных из яда змей нейротоксинов «короткого» и «длинного» типов. Обсуждаются структурно-функциональные соотношения для этих биологически активных молекул.

#### СОДЕРЖАНИЕ

##### Введение

1. Спин-спиновые взаимодействия в пептидах
2. Применение спин-спиновых взаимодействий для конформационного анализа валиномицина
3. Отнесение сигналов в спектрах ЯМР белково-пептидных веществ
  - 3.1. Первый уровень отнесения (типы спиновых систем аминокислотных остатков)
  - 3.2. Второй уровень отнесения (последовательность остатков)
4. ЯМР-исследование пространственной структуры нейротоксинов
  - 4.1. Апамина
  - 4.2. Инсектотоксин I<sub>5</sub>A
  - 4.3. Нейротоксины змей
5. Трехмерная структура двойных спиралей грамицидина А
6. Заключение

#### Введение

Применение спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) высокого разрешения оказало решающее влияние на изучение конформации пептидов и белков в растворе, сравнимое с вкладом рентгеноструктурного анализа веществ в кристаллическом состоянии. Общеизвестно, что биологическая активность белково-пептидных веществ определяется их химической и пространственной структурой. Установление трехмерной конформации полипептидов в растворах как основы их механизма действия и отправной позиции для целенаправленного синтеза новых физиологически активных соединений является одной из наиболее важных задач, которые ставит биоорганическая химия перед физико-химическими методами. Кроме того, не меньшее значение имеют проблемы, связанные с динамическими аспектами пространственной структуры молекулы и степенью ее подвижности при физиологических условиях окружения. Даже неболь-

Использованы сокращения для обозначения аминокислотных остатков в однобуквенном и трехбуквенном коде, а также аббревиатура и символы для описания конформации полипептидных цепей, рекомендуемые номенклатурным комитетом IUPAC-IUB [1].

шие конформационные переходы могут играть серьезную роль в механизме биологического действия полипептидов. Поэтому необходимо не только определять структуру молекул и, например, связывающего центра при лиганд-рецепторном взаимодействии, но и представить данные об изменении конформации, если таковая происходит, при смене условий и в процессе связывания.

Среди различных спектроскопических методов наиболее эффективен для изучения молекул и их взаимодействий в растворах ядерный магнитный резонанс, который способен:

- определить динамическую конформацию и межмолекулярные взаимодействия при различных условиях окружения, включая физиологические,
- найти специфические внутримолекулярные взаимодействия, приводящие к конкретным конформационным свойствам,
- идентифицировать определенные химические группы, участвующие во взаимодействии с биологической мишенью, например с лигандами и рецепторами,
- выявить роль пространственной структуры молекулы и ее динамических свойств в данном биологическом процессе, осуществляемом этой молекулой, и таким образом ответить на вопрос — почему природа создала именно такую молекулу для данной цели, а не другую.

Принимая во внимание структурные особенности пептидно-белковых молекул, были проведены серьезные модификации стандартных методов ЯМР и разработаны новые подходы с тем, чтобы этот мощный метод использовался с наибольшей отдачей в этой области исследований. Среди многих методических приемов ЯМР, широко используемых в настоящее время для изучения полипептидов [2], наиболее информативны двухмерная (2D) спектроскопия [3, 4], интерпретация вицинальных констант спин-спинового взаимодействия [5] и пертурбация спектров специфическими внутри- и межмолекулярными метками [1, 2, 6, 7].

Современный конформационный ЯМР-анализ пептидов и относительно небольших белков проводится по следующим основным этапам: а) выделение ЯМР-сигналов и их отнесение к определенному аминокислотному остатку в первичной структуре полипептида, б) оценка степени подвижности структуры молекулы при различных условиях окружения, в) установление специфических меж- и внутримолекулярных взаимодействий (водородных связей, электростатических диполь-дипольных взаимодействий, мест связывания с металлом, гидрофобных взаимодействий и групп, находящихся в контакте с растворителем), г) построение трехмерной структуры молекул, обладающих фиксированной или доминирующей конформацией в растворе, д) выявление локальных конформационных переходов при изменении среды и специфических межмолекулярных взаимодействиях.

Следует подчеркнуть, однако, что наиболее эффективный и экономичный путь конформационного анализа даже простых олигопептидов в растворах заключается в сочетании ЯМР-спектроскопии с другими методами, а именно: круговым дихроизмом, ИК-спектроскопией и спектроскопией комбинационного рассеивания света, использованием селективных спиновых и флуоресцентных меток, теоретическим конформационным анализом и т. д. [8]. В таком комбинированном подходе результаты, полученные каждым отдельным методом, используются для ответа на такие вопросы, на которые они призваны отвечать, и это позволяет решить общую проблему наиболее эффективным образом.

Данная статья представляет собой краткий обзор результатов, полученных в Институте биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, по развитию конформационного ЯМР-анализа и его применению для определения структуры ряда важных природных пептидов и небольших белков.

#### 1. Спин-спиновые взаимодействия в пептидах

Среди ЯМР-параметров, продуктивно используемых в настоящее время в конформационном анализе пептидных систем, важное место занимают

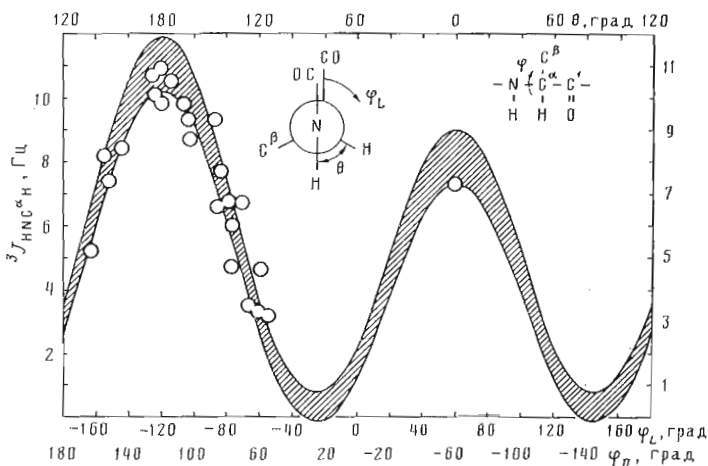


Рис. 1. Зависимость вицинального протонного взаимодействия  $\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H}$  от двугранного угла  $\theta$  и торсионного угла  $\varphi$  для пептидов с *транс*-амидными связями [5, 6, 9, 13, 15]. Индексы *L* и *D* отвечают *L*- и *D*-аминокислотным остаткам. Приведенные экспериментальные данные собраны в табл. 4 обзора [5] и в [6]

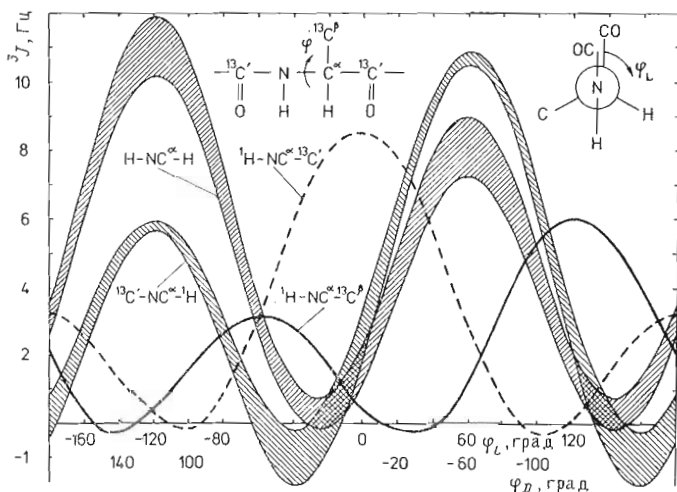


Рис. 2. Зависимость вицинальных констант взаимодействия от угла  $\varphi$ . Соотношения для  $\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H}$  и  $^{13}\text{C}'(\text{O})-\text{NC}^\alpha-\text{H}$  (заштрихованные области) калиброваны по экспериментальным данным соответственно в [5, 6, 9, 13-15] и в [18], две другие зависимости рассчитаны для диамида аланинового остатка [15]

константы спин-спинового взаимодействия. Изотопы с магнитно-активными ядрами  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$ , входящие в состав аминокислотных остатков, обуславливают многочисленные взаимодействия [5]. Среди них вицинальные взаимодействия (через три химические связи)  $^3J$  являются ключевыми для конформационного анализа молекул вследствие их способности предоставить информацию о торсионных углах  $\varphi$ ,  $\psi$  и  $\chi^1$  аминокислотного остатка.

Зависимость протон-протонного взаимодействия  $\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H}$  от торсионного угла  $\varphi$  была сначала определена [9, 10] при изучении методами ЯМР и инфракрасной спектроскопии конформационных состояний дипептидов в  $\text{CS}_2$  и хлороформе в предположении о соблюдении общего вида соотношения Карплюса [11, 12]. В дальнейшем экспериментальные данные, накопленные в процессе ЯМР-исследований конформации пептидов, позволили уточнить [13, 14] эту зависимость до окончательного вида (рис. 1). Среднее значение константы взаимодействия по допустимому диапазону значений для данного торсионного угла, показанного

на рис. 1 заштрихованной областью, аппроксимируется уравнением

$${}^3J(\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H}) = 9,4 \cos^2(60 - \varphi_L) - 1,1 \cos(60 - \varphi_L) + 0,4. \quad (1)$$

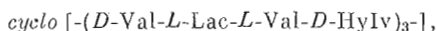
На этом же рисунке представлены имеющиеся экспериментальные данные для конформационно жестких пептидов с *транс*-амидными связями, пространственная структура которых определена рентгеноструктурным анализом (подробнее см. обзоры [5, 6]). Теоретический расчет  $\varphi$ -зависимости  ${}^3J(\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H})$  методом самосогласованных возмущений [15, 16] в основном подтверждает эмпирическую закономерность. Примененность этой константы взаимодействия для белков также широко отражена в литературе (см., например, [17]).

В общем случае угловая зависимость  ${}^3J(\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H})$  дает для пептидов с фиксированной или доминирующей пространственной структурой четыре разных угла  $\varphi$  для одного значения константы. Чтобы снять эту неоднозначность, можно привлекать обсуждение других экспериментальных результатов и данных теоретического конформационного анализа. ЯМР-спектроскопия решает эту проблему с привлечением гетероядерных вицинальных  ${}^{13}\text{C}\dots{}^1\text{H}$ -взаимодействий [5] и ядерного эффекта Оверхаузера [4].

Теоретические расчеты [15] с использованием метода конечных возмущений для ферми-контактного члена и волновых функций типа INDO показывают, что  $\varphi$ -зависимости вицинальных  ${}^3J$ -констант взаимодействия  ${}^1\text{H}-\text{NC}^\alpha-{}^{13}\text{C}'(\text{O})$ ,  ${}^1\text{H}-\text{NC}^\alpha-{}^{13}\text{C}^\beta$  и  ${}^{13}\text{C}'(\text{O})-\text{NC}^\alpha-{}^1\text{H}$  в пептидном фрагменте  $-\text{C}'(\text{O})-\text{NH}-\text{C}^\alpha\text{H}(\text{C}^\beta\text{H})-\text{C}'(\text{O})-$  подчиняются общей форме уравнения (1). Зависимость для последнего указанного взаимодействия была калибрована по экспериментальным данным [18]. Графики полного набора вицинальных констант для фрагментов с центральной пептидной связью  $\text{N}-\text{C}^\alpha$  приведены на рис. 2. Разные положения экстремумов этих зависимостей относительно угла  $\varphi$  гарантируют однозначное определение торсионного угла. Этот подход был использован для изучения конформации валиномицина, как будет показано ниже.

## 2. Применение спин-спиновых взаимодействий для конформационного анализа валиномицина

Валиномицин представляет собой циклический депсипептид, состоящий из 12 амино- и оксикислотных остатков:



где  $\text{HyIv}$ — остаток  $\alpha$ -оксиэвалериановой кислоты. Валиномицин отличается уникальной способностью селективно транспортировать катионы калия через природные и модельные мембраны [8]. Спектральные методы показали [19, 20], что валиномицин принимает три основные конформации в растворах, свойства которых моделируют окружение его молекул в мембране: форму А («браслет»), доминирующую в неполярных растворах, например в гентане,  $\text{CCl}_4$  и т. п., в которой все шесть  $\text{NH}$ -групп образуют  $4 \rightarrow 1$ -водородные связи с карбонильными группами ( $\beta$ -изгибы) оксикислотных остатков (амидными карбонилами); форму В («пропеллер»), преобладающую в средах средней полярности и имеющую только три внутримолекулярные  $4 \rightarrow 1$ -водородные связи; форму С, характерную для полярных сред, в которой молекулы растворителя сольватируют все  $\text{NH}$ -группы валиномицина.

Конформация симметричного «браслета» (форма А) валиномицина в растворе может быть в принципе реализована несколькими структурами, принадлежащими к двум основным группам  $A_1$  и  $A_2$ , которые различаются противоположной хиральностью циклической системы и ориентацией боковых цепей амино- и оксикислотных остатков [20]. Решение проблемы конформационных состояний валиномицина в растворе было окончательно достигнуто путем использования трех вицинальных констант спин-спинового взаимодействия:  $\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H}$ ,  ${}^{13}\text{C}'-\text{NC}^\alpha-{}^1\text{H}$  и  ${}^1\text{H}-\text{NC}^\alpha-{}^{13}\text{C}^\beta$ . Сравнение этих констант позволило однозначно определить торсион-

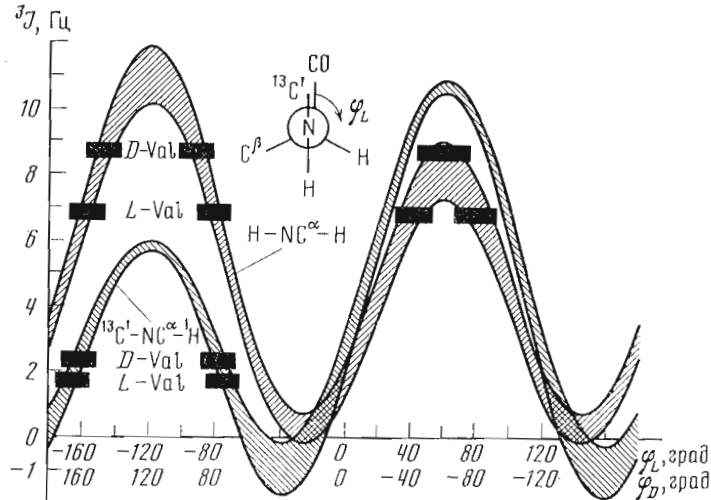


Рис. 3. Сравнение зависимости констант взаимодействия  $\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H}$  и  $^{13}\text{C}'-\text{NC}^\alpha-\text{H}$  от угла  $\varphi$ . Прямоугольники отвечают экспериментальным данным для валиномицина в растворе  $\text{C}^2\text{HCl}_3$

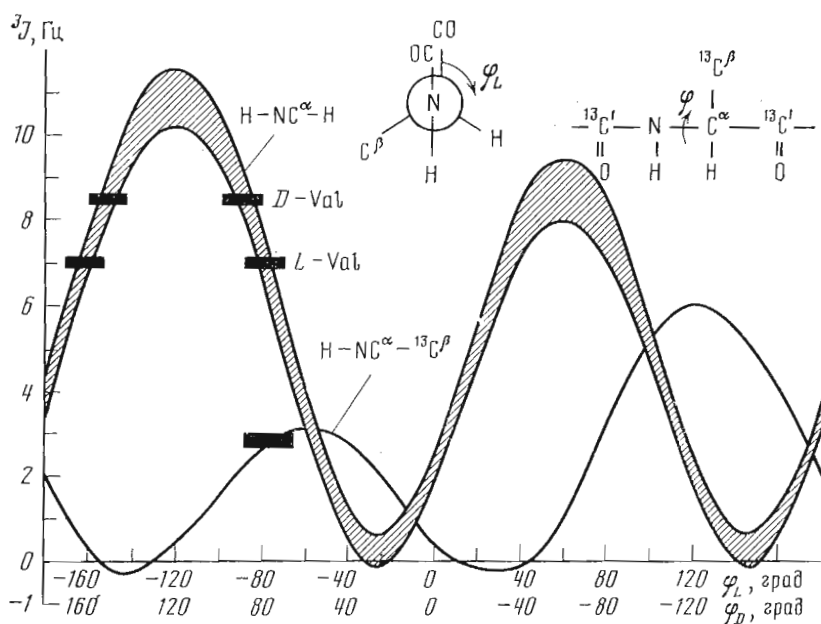


Рис. 4. Сравнение зависимости констант взаимодействия  $\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H}$  и  $^1\text{H}-\text{NC}^\alpha-^{13}\text{C}^\beta$  от угла  $\varphi$ . Прямоугольники отвечают экспериментальным данным для валиномицина в растворе  $\text{C}^2\text{HCl}_3$

ные углы  $\varphi$  в аминокислотных остатках, а для валиномицина в неполярной среде — отобразить доминирующую пространственную структуру из набора возможных «браслетных» конформаций [19].

Экспериментальные значения  $\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H}$  для *L*- и *D*-валиновых остатков дают в соответствии со стереохимической зависимостью (рис. 1) четыре значения торсионного угла  $\varphi$ . Число этих вариантов можно уменьшить с помощью гетероядерной вицинальной константы взаимодействия  $^{13}\text{C}'-\text{NC}^\alpha-\text{H}$ . Для измерения этой  $^{13}\text{C}'\cdots\text{H}$ -константы применяли гетероядерный двойной и тройной резонанс с селективным облучением протонных сигналов [18, 19].

На рис. 3 представлены угловые зависимости констант взаимодействия  $^3J(\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H})$  и  $^3J(^{13}\text{C}'-\text{NC}^\alpha-\text{H})$ , на которых отложены экспериментальные значения соответствующих констант для раствора валино-

мицина в  $C^2HCl_3$ . Сравнение показывает, что конформация типа  $A_1$  с торсионными углами  $\varphi$  в правой части рис. 3 не реализуется. Два допустимых решения находятся в левой части угловой зависимости. Выбор

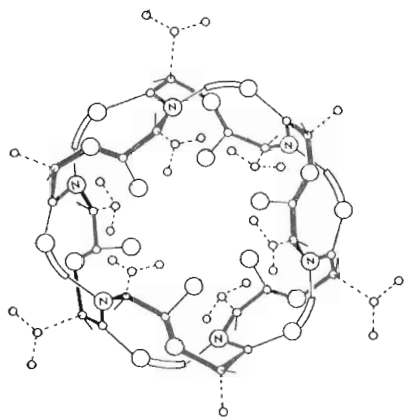


Рис. 5. Доминирующая «браслетная» конформация валиномицина (форма  $A_2$ ) в неполярных растворителях

$\varphi=90^\circ$  ( $D$ -Val) с возможной погрешностью  $\pm 5^\circ$ . По-видимому, более значительное отклонение угла  $\varphi$  для  $D$ -валинового остатка от стандартных значений  $\varphi$  в  $\beta$ -изгибах [21] обусловлено конформационными перестройками с дестабилизацией  $\beta$ -изгибов, содержащих  $D$ -валиновый остаток. Углы  $\varphi$  оксикислотных остатков могут быть определены только по одной константе  $-^3J(^{13}C'-OC^\alpha-H)$ . Полагая, что  $\varphi$ -угловая зависимость этой константы аналогична константе  $^{13}C'-NC^\alpha-H$ , мы получили допустимые углы  $\varphi$  в области  $-(95-145^\circ)$ ,  $\sim 0$  и  $120^\circ$  для остатка  $L$ -молочной кислоты и в области  $(95-145^\circ)$ ,  $\sim 0$  и  $-120^\circ$  для остатка  $D$ -оксиэвалериановой кислоты. Две последние области,  $\sim 0$  и  $\pm 120^\circ$ , запрещены для  $\beta$ -изгибов по структурно-энергетическим соображениям, тогда как практически весь диапазон  $95-145^\circ$  разрешен [21]. Имеющиеся данные для оксикислотных остатков пока недостаточны для дальнейшего уточнения углов  $\varphi$ . Для построения пространственной модели «браслета» валиномицина мы выбрали значения  $\varphi_L = -120^\circ$  и  $\varphi_D = 120^\circ$ .

Угол  $\psi$  в валиномицине можно оценить только для оксикислотных остатков по константе взаимодействия  $^3J(^1H-C^\alpha C'-^{15}N)$ . Меченный изотопом  $^{15}N$  аналог [ $^{15}N$ ]L-Val $^{3,7,11}$ ] валиномицин дает для этой константы значение 1,2 Гц. Согласно ее угловой зависимости [18, 22], такое значение соответствует углу  $\psi \sim 0^\circ$  для остатка  $L$ -молочной кислоты, который типичен для угла  $\psi_{i+2}$  в  $\beta$ -изгибах [21]. Принимая во внимание симметрию валиномициновой структуры, можно полагать, что для остатка  $D$ -оксиэвалериановой кислоты угол также находится вблизи  $0^\circ$ .

Итак, шесть  $\beta$ -изгибов, стабилизирующих «браслетную»  $A_2$ -конформацию валиномицина, принадлежат типу II для  $LD$ -последовательности и типу II' для  $DL$ -последовательности.

Конформационное состояние связей  $C^\alpha-C^\beta$  для боковых цепей  $L$ - и  $D$ -валинов и остатка  $D$ -оксиэвалериановой кислоты в неполярных растворителях определены по константам  $H-C^\alpha C^\beta-H$  и  $^1H-C^\beta C^\alpha-^{13}C'$  [19].

С использованием всех сведений, полученных путем конформационного ЯМР-анализа, построена молекулярная модель валиномицина в неполярных растворах (рис. 5). Она представляет собой симметричную (близкую к  $C_3$ -аксиальному типу), жесткую структуру, напоминающую браслет. Конформационная жесткость обеспечивается конденсированной

один из них осуществленной с помощью гетероядерной вициальной константы взаимодействия  $^3J(^1H-NC^\alpha-^{13}C^\beta)$  (рис. 4). Из ее угловой зависимости следует, что одно из возможных значений угла  $\varphi$  в области  $-160^\circ$  для  $L$ -валинового и  $150^\circ$  для  $D$ -валинового остатка отвечает низким значениям константы, близким к 0. Наблюдаемые значения констант согласуются с другим возможным вариантом (рис. 4) — углами  $\varphi$  в области  $\sim -80^\circ$  (для  $L$ -валинового остатка) и  $\sim 90^\circ$  (для  $D$ -валинового остатка). Необходимо добавить, что первый вариант нереален также, исходя из общих структурных соображений: с такими углами  $\varphi$ , как следует из теоретических расчетов и молекулярных моделей [21], не могут образоваться внутримолекулярные водородные связи в  $4 \rightarrow 1$ - $\beta$ -изгибе.

Таким образом, единственным решением является  $\varphi = -80^\circ$  ( $L$ -Val) и

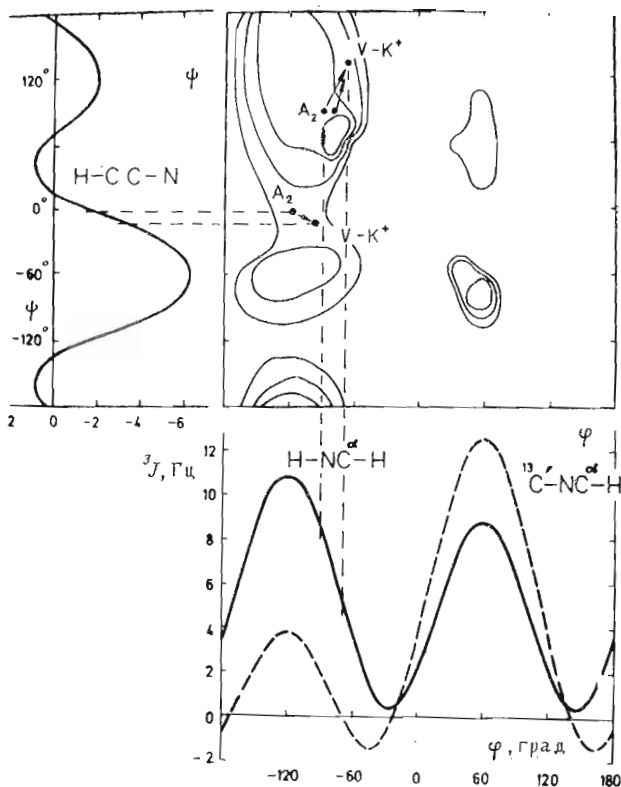


Рис. 6. Изменение торсионных углов  $\phi$  и  $\psi$  основной цепи, сопровождающее конформационный переход свободного валиномицина в неполярной среде в комплексе с  $K^+$  ( $V-K^+$ ). Стрелки на конформационной  $\phi, \psi$ -карте пептидного фрагмента указывают на изменение углов для остатков  $L$ - и  $D$ -Val (две верхние стрелки) и  $L$ -Lac и  $D$ -HyIv (нижняя стрелка). Внизу и слева от конформационной карты приведены зависимости констант вицинального взаимодействия  $H-NC^\alpha-H$  и  $^{13}C'-NC^\beta-^1H$  от угла  $\phi$ , а также  $^1H-C^\alpha C'-^{15}N$  от угла  $\psi$  [18, 27]. Для  $D$ -остатков углы  $\phi$  и  $\psi$  получают инверсией относительно точки  $(0, 0)$

системой шести внутримолекулярных водородных связей, определяющей  $\beta$ -изгибы [19, 20]. В противоположность ЯМР-анализу рентгеноструктурная кристаллическая структура валиномицина оказалась значительно менее симметричной, обладающей только центром псевдосимметрии [22]. Однако спектры комбинационного рассеивания света для кристаллов валиномицина, выращенных из других растворов, чем кристаллы для рентгеноструктурного анализа, показали симметричную пространственную структуру [23]. Противоречие между ЯМР- и рентгеноструктурной конформацией практически было устранено тем, что кристаллическая структура близкого аналога валиномицина,  $[L-HyIv]_3$  валиномицина: *cyclo*[-( $D$ -Val- $L$ -HyIv- $L$ -Val- $D$ -HyIv) $_3$ -] [24] в точности соответствует ЯМР-конформации самого валиномицина, показанной на рис. 5.

Важной особенностью «браслета» является то, что в этой конформации валиномицин подготовлен для включения катиона калия во внутреннюю полость и для прочного его связывания шестью сложноэфирными карбонилами, расположенными на периферии полости. ЯМР-[19, 20, 25] и рентгеноструктурный анализ [26] привели к практически идентичной структуре комплекса  $K^+$ -валиномицина в растворе и кристалле. Конформационные изменения, которые сопровождают образование комплекса, в основном связаны с переориентацией сложноэфирных карбониллов во внутреннюю полость молекулы. Для общей конформации эти изменения не представляются значительными. Это можно увидеть на рис. 6, где показаны изменения, претерпеваемые торсионными углами  $\phi$  и  $\psi$  основной цепи при трансформации свободного валиномицина в калиевый

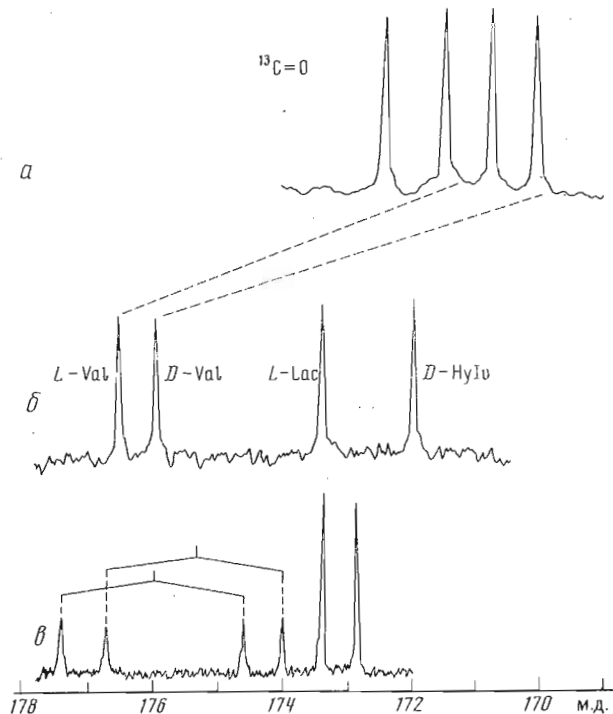


Рис. 7. Карбонильная область спектра  $^{13}\text{C}$ -ЯМР при шумовом подавлении (25,2 МГц, ФТ-ЯМР-спектрометр типа Varian XL-100-15) для 0,09 М растворов в  $\text{C}^2\text{HCl}_3$  валиномицина (а), комплекса  $\text{K}^+$  – валиномицин (б), комплекса  $\text{Tl}^+$  – валиномицин (в). Расщепления в последнем спектре обусловлены спин-спиновым взаимодействием  $^{203,205}\text{Tl} \dots ^{13}\text{C}'$ . Химические сдвиги отсчитаны относительно внутреннего эталона – тетраметилсилана

комплекс. Тем не менее эти небольшие изменения весьма эффективно отражаются константами взаимодействия [6, 19].

Что касается комплекса валиномицина, то ЯМР дополнительно дает прямые сведения о донор-акцепторных свойствах связывания металла и лиганда [19, 25]. В качестве магнитной метки для этой цели использован таллий, два изотопа которого,  $^{203}\text{Tl}$  (природное содержание 29,5%) и  $^{205}\text{Tl}$  (70,5%), имеют ядерный спин  $1/2$ . Ионный радиус  $\text{Tl}^+$  (1,5 Å) близок к радиусу калия (1,35 Å) и константа стабильности комплекса валиномицина с катионом таллия по порядку величины близка к константе  $\text{K}^+$ -комплекса. Спектры  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР комплекса с  $\text{Tl}^+$  [19] характеризуются практически такими же химическими сдвигами и константами спин-спинового взаимодействия, как и  $\text{K}^+$ -комплекс [25], что указывает на полное подобие пространственных структур этих двух комплексов [19].

Важной особенностью  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра комплекса валиномицин– $\text{Tl}^+$  в  $\text{C}^2\text{HCl}_3$  (рис. 7) является расщепление сигналов  $^{13}\text{C}$  из-за спинового взаимодействия с ядрами таллия [19]. Так как гироманнитные отношения ядер  $^{203}\text{Tl}$  и  $^{205}\text{Tl}$  различаются только на 1%, расщепление представляет собой простые дублеты. Обусловленность расщепления спин-спиновым взаимодействием доказана сравнением спектров, снятых при разных частотах (20, 25 и 75 МГц). Ядра калия и ряда других металлов (например, рубидия и цезия), с которыми валиномицин образует стабильные комплексы, имеют спины  $>1/2$  и вследствие наличия электрического квадрупольного момента обладают высокой скоростью релаксации, что «смазывает» их спин-спиновое взаимодействие с ядрами  $^{13}\text{C}$  [25].

Сильное спин-спиновое взаимодействие ядер  $^{203,205}\text{Tl}$  наблюдается на  $^{13}\text{C}'$ -сигналах от *L*- и *D*-валиновых карбониллов, но отсутствует на сигналах от карбониллов остатков *L*-молочной и *D*-оксиизовалериановой кислот.



Это свидетельствует о донор-акцепторном связывании иона металла именно со сложноэфирными карбонильными группами, причем *L*-валиновый карбонил имеет более высокую константу взаимодействия (103,2 Гц), чем *D*-валиновый (96,4 Гц). Эта разница качественно согласуется с данными рентгеноструктурного анализа  $K^+$ -комплекса валиномицина [26], которые указывают на более короткое среднее расстояние  $K^+ \dots O=C'$  для *L*-валиновых карбониллов (2,69; 2,72 и 2,75 Å), чем для *D*-валиновых карбониллов (2,74; 2,81 и 2,83 Å).

Углероды  $C^\alpha$  остатков *L*-молочной и *D*-оксиэвалериановой кислот также имеют расщепление (соответственно 8,1 и 3,7 Гц), отвечающее взаимодействию с ядром Tl через четыре связи. Взаимодействие Tl через три связи с  $C^\alpha$ -углеродами *L*- и *D*-валиновых остатков не наблюдается. Согласно молекулярной модели комплекса, двугранный угол  $Tl \dots O=C'-C$  для этой вицинальной константы близок к  $90^\circ$ , что должно отвечать константе  $^3J \sim 0$  Гц, если она подчиняется угловому соотношению Карплуса (см. ур-ние (1)). Взаимодействие Tl с протонами ( $^4J_{Tl-H}$ ) не наблюдается в спектрах  $^1H$ -ЯМР.

Присутствие в спектре спин-спинового взаимодействия  $^{13}C' \dots ^{203,205}Tl$  свидетельствует о сравнительно медленной скорости обмена иона таллия между комплексами в  $C^2HCl_3$ . Судя по ширине компонентов дублетов  $^{13}C$ -сигналов, время жизни комплекса превышает 1 с (при  $40^\circ C$ ). Возрастание полярности растворителя, например при добавлении небольших количеств метанола ( $\sim 5\%$  по объему), приводит к увеличению скорости обмена и «смазыванию» расщепления. Расщепление также исчезает из-за обмена, если число ионов таллия в растворе меньше, чем число молекул валиномицина.

В заключение отметим, что исследование валиномицина заложило прочные основы практического применения констант спин-спинового взаимодействия для определения структуры молекул в растворе и также показало их применимость для отнесения сигналов в  $^1H$ - и  $^{13}C$ -ЯМР-спектрах пептидов и белков [9].

### 3. Отнесение сигналов в спектрах ЯМР белково-пептидных веществ

Исходной предпосылкой для продуктивного применения ЯМР в конформационном анализе пептидов и белков является разрешение ЯМР-сигналов и их отнесение к конкретным аминокислотным остаткам. Так как в общем случае полипептидная цепь содержит большинство разных аминокислотных остатков более чем один раз, следует рассмотреть два уровня отнесения [28].

#### 3.1. Первый уровень отнесения (типы спиновых систем аминокислотных остатков)

Сначала протонные сигналы необходимо отнести по типам спиновых систем, подразделив аминокислотные остатки по этому признаку. При этом используют селективный многочастотный резонанс в сочетании с разностной спектроскопией [6] и с недавнего времени 2D-спин-коррелированную спектроскопию [3], чтобы выявить в  $^1H$ -ЯМР-спектре связанные спин-спиновым взаимодействием ( $NH-C^\alpha H-C^\beta H-$  и т. д.) группы протонов, которые соответствуют индивидуальным аминокислотным остаткам или, в более общем виде, определенному типу спиновой системы аминокислотных остатков. Для протонов наблюдаются только геминальные и вицинальные взаимодействия внутри аминокислотного остатка. Дальнейшее взаимодействие через четыре и пять химических связей между протонами, расположенными в соседних остатках, не наблюдается из-за малой величины их константы ( $< 1$  Гц) [5]. Таким образом, спиновые системы каждого из 20 стандартных аминокислотных остатков можно рассматривать отдельно и следующим образом классифицировать их

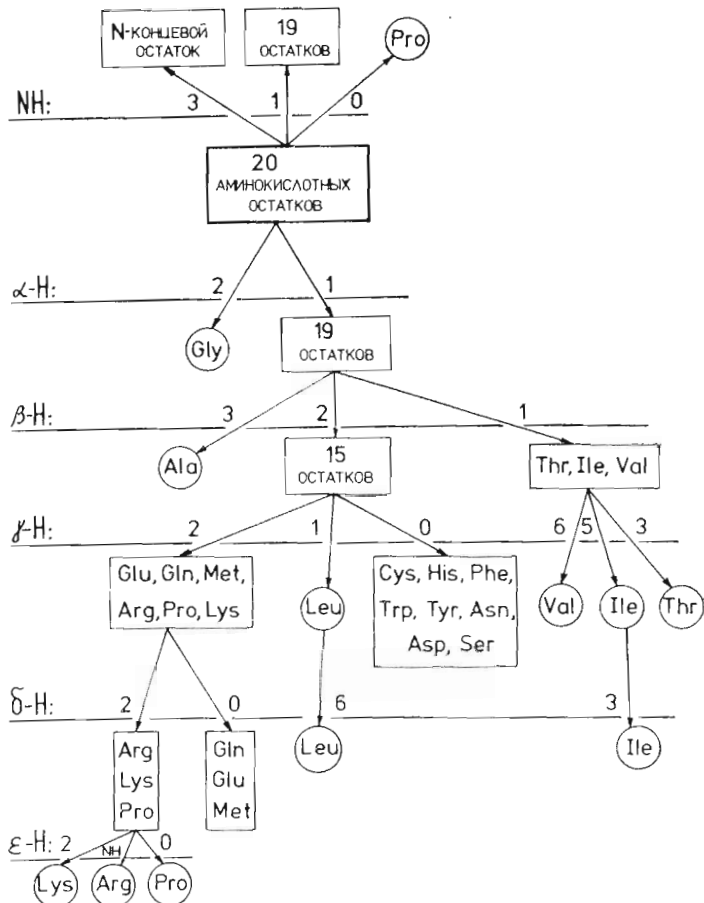


Рис. 8. Классификация аминокислотных остатков согласно типу мультиплетности их протонных спиновых систем (см. текст)

согласно числу взаимодействующих протонов в N-,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - и  $\epsilon$ -положениях (рис. 8).

**N-Протоны.** Особенностью пролинового остатка является отсутствие амидного протона NH, который имеется во всех других остатках полипептидной цепи. Поэтому при облучении  $C^{\alpha}H$ -резонанса пролина не будет отклика в NH-области спектра  $^1H$ -ЯМР. Однако отклик также будет отсутствовать для N-концевых остатков, для которых спиновое взаимодействие во фрагменте  $H_3N^+-C^{\alpha}H$  «смазано» из-за быстрого обмена водородов  $N^+H$  с водной средой. Для различения двух типов остатков следует полагаться на pH-зависимость химических сдвигов СН сигналов N-концевого остатка (например, сигнал  $C^{\alpha}H$  смещается в слабое поле на  $\Delta\delta \sim 0,5$  м.д. при уменьшении кислотности раствора,  $pK_a \sim 8$ ).

**$\alpha$ -Протоны.** Глицин является единственным остатком с двумя  $\alpha$ -протонами и без  $\beta$ -протонов. Вследствие сравнительно большой величины геминального взаимодействия протонов  $C^{\alpha}H_2$  ( $^2J_{\alpha\alpha} \sim 15$  Гц) их сигналы можно отличить от других и идентифицировать спиновый мультиплет глицина.

**$\beta$ -Протоны.** 19 аминокислотных остатков, содержащих один  $\alpha$ -протон, подразделяются на три группы в зависимости от числа протонов в  $\beta$ -положении (см. рис. 8). Сигналы аланинового остатка можно однозначно идентифицировать, наблюдая, например, отклик резонанса  $C^{\beta}H_2$  при облучении протона  $C^{\alpha}H$ .

**$\gamma$ -Протоны.** Упомянутые выше 15 остатков с одним  $\alpha$ - и двумя  $\beta$ -протонами разделяются по химической структуре в  $\gamma$ -положении на группы, имеющие в  $\gamma$ -положении один или два протона и не имеющие таковых (см. рис. 8). Остатки с одним  $\alpha$ - и одним  $\beta$ -протоном (треонин, изолейцин,

валин) также различаются по  $\gamma$ -положению: треонин имеет одну  $\gamma$ -метильную группу (три  $\gamma$ -протона), изолейцин — метиленовую и метильную группы (пять  $\gamma$ -протонов) и валин — две метильные группы (шесть  $\gamma$ -протонов). В соответствии с числом  $\gamma$ -протонов можно отнести спиновые системы остатков лейцина, треонина, изолейцина и валина. Идентификации способствует присутствие в боковых цепях этих остатков метильных групп, которые дают заметные сигналы в сильнополюсной области спектра. Например, спиновый мультиплет изолейцинового остатка отличается своим триплетным сигналом от метильной группы  $C^6H_2$ , тогда как спектр лейцинового остатка содержит два дублета от  $C^6H_2$ -групп. Спиновый мультиплет аспарагиновой кислоты можно различить по рН-зависимости химического сдвига  $C^6H_2$ -протонов ( $\Delta\delta \sim 0,25$  м.д.,  $pK_a \sim 4$ ). Для отнесения остатков Ser можно использовать относительно низкое абсолютное значение геминальной константы взаимодействия  $C^6H_2$  ( ${}^2J_{\beta\beta'} = 10-13$  Гц) по сравнению с другими остатками ( ${}^2J_{\beta\beta'} = 13-17,5$  Гц), что обусловлено эффектом электроотрицательности заместителя ОН при  $C^6$ -атоме. Спектры остатков фенилаланина, триптофана, тирозина и гистидина можно различить по ядерному эффекту Оверхаузера между  $C^6H_2$  и ближайшими ароматическими протонами, спиновые системы которых идентифицируются дополнительными экспериментами.

*$\delta$ -Протоны.* Остатки, имеющие по два  $\gamma$ -протона, можно дальше разделить на две группы: содержащие по два  $\delta$ -протона и не имеющие протонов в  $\delta$ -положении (см. рис. 8). Сигналы глутаминовой кислоты можно достаточно уверенно отнести по рН-зависимости химического сдвига  $C^1H_2$ -протонов ( $\Delta\delta \sim 0,2$  м.д.,  $pK_a \sim 4,5$ ), а сигналы остатка Lys при благоприятных обстоятельствах — по рН-зависимости,  $C^6H_2$  и  $C^8H_2$  ( $\Delta\delta \sim 0,2$  и  $\sim 0,4$  м.д. соответственно,  $pK_a \sim 10$ ).

*$\epsilon$ -Протоны.* Мультиплеты лизина и аргинина различаются тем, что лизин имеет два  $C^6H_2$ -протона, а аргинин — один  $\epsilon$ -NH-протон. Пролиновый остаток не имеет протонов в  $\epsilon$ -положении.

Итак, большинство субспектров аминокислотных остатков могут быть дискриминированы по проявлению их мультиплетов. Однако аминокислотные остатки в группах цистеин (цистин) и аспарагин, а также глутамин и метионин трудно, как правило, различить на первом уровне отнесения сигналов, так как они имеют одинаковые спиновые системы и не обладают специальными ЯМР-параметрами. Иногда, правда, проявляется ядерный эффект Оверхаузера между протонами NH боковой цепи и ближайшей к ним  $C^1H_2$ -группы, что позволяет идентифицировать сигналы аспарагинового и глутаминового остатков. В целом эта проблема решается на следующем этапе процесса отнесения.

### 3.2. Второй уровень отнесения (последовательность остатков)

Второй уровень означает отнесение выделенной спиновой системы к определенному положению в аминокислотной последовательности. Достиж этой цели на первом уровне можно только в тривиальном случае — если в первичной структуре полипептида присутствует только один остаток с определенным типом спиновой системы. Конечно, рассмотрение эффектов парамагнитных зондов и рН-зависимости сдвигов совместно с известным рентгеноструктурным трехмерным строением может дать некоторые дополнительные сведения для отнесения сигналов. Селективное введение изотопов  ${}^2H$ ,  ${}^{13}C$  и  ${}^{15}N$  дает вполне однозначные результаты, но требует значительных затрат на химические или биосинтетические работы по приготовлению соответствующих веществ.

Спектроскопия ЯМР предоставляет два метода определения последовательности аминокислотных остатков в пептидах и белках: ядерный эффект Оверхаузера между протонами соседних аминокислотных остатков [29] и гетероядерный двойной резонанс [28, 30]. Ниже излагается методика второго способа отнесения сигналов.

Принцип метода отнесения сигналов с помощью гетероядерного подавления вытекает из рассмотрения спиновой системы ядер  ${}^1H$  и  ${}^{13}C$  (рис. 9).

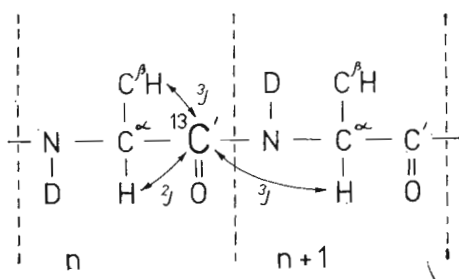


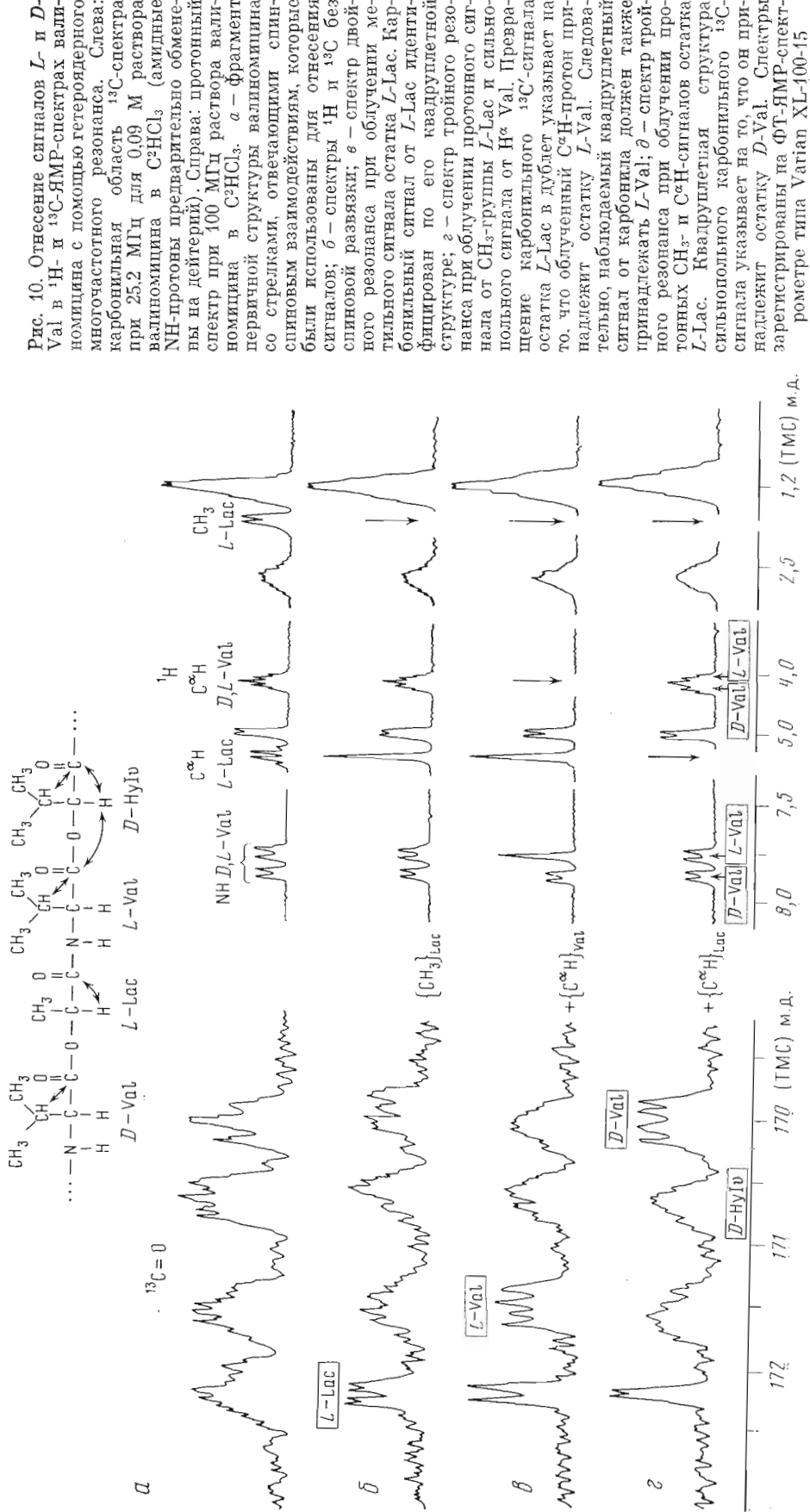
Рис. 9. Гетероядерная спиновая  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ -система для двух соседних остатков в полипептидной цепи

Система состоит из протонов  $\text{H}^\alpha$  и  $\text{H}^\beta$  и карбонильного ядра  $^{13}\text{C}'$ , константы взаимодействия между которыми находятся в следующих пределах [5]:  $^2J(^1\text{H}-\text{C}^\alpha-^{13}\text{C}') \sim 4,2-7,3$  Гц,  $^3J(^{13}\text{C}'-\text{NC}^\alpha-^1\text{H}) \sim 0-4,3$  Гц и  $^3J(^1\text{H}-\text{C}^\beta\text{C}^\alpha-^{13}\text{C}') \sim 1,3-9,8$  Гц. Протон  $\text{NH}$ , также связанный с карбонильным ядром  $^{13}\text{C}'$  константами взаимодействия  $^2J(^{13}\text{C}'-\text{N}-^1\text{H}) \sim 2,4-5,5$  Гц и  $^3J(^1\text{H}-\text{NC}^\alpha-^{13}\text{C}') \sim 0-6$  Гц, может быть обменен на дейтерий, чтобы упростить спектр.

В этой гетероядерной системе можно выделить две протонные подсистемы соседних аминокислотных остатков,  $n$  и  $n+1$ , которые связаны взаимодействием между ядром  $^{13}\text{C}'$  остатка  $n$  и протоном  $\text{H}^\alpha$  остатка  $n+1$ . Это взаимодействие можно наблюдать в следующем эксперименте. Если селективно облучить сигналы от протонов  $\text{H}^\alpha$  и  $\text{H}^\beta$  остатка  $n$ , то в карбонильной области спектра  $^{13}\text{C}$  должен наблюдаться дублет, отвечающий карбонильному углероду этого же остатка с расщеплением, обусловленным вицинальным взаимодействием с протоном  $\text{H}^\alpha$  остатка  $n+1$ . Выбор нужного резонанса  $\text{H}_{n+1}^\alpha$  проводится среди протонных спиновых систем, чей тип мультиплетности соответствует  $n+1$ -му аминокислотному остатку. Настраивая путем проб и ошибок дополнительную частоту облучения по форме выбранного сигнала  $^{13}\text{C}'$ , можно найти спектральное положение протонного  $\text{H}_{n+1}^\alpha$ -сигнала. Этим способом идентифицируют и связывают между собой подсистемы протонных резонансов соседних аминокислотных остатков. Процедура существенно упрощается, если протонные сигналы одной подсистемы уже отнесены к конкретному остатку, например к единственному типу аминокислоты в первичной структуре или к N-концевому остатку со специфической рН-зависимостью химических сдвигов. Продолжая эти эксперименты, можно проследить полную аминокислотную последовательность полипептида и однозначно отнести протонные и карбонильные  $^{13}\text{C}'$ -сигналы к индивидуальным остаткам. Остальные сигналы в спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР можно идентифицировать с помощью селективного гетероядерного подавления отнесенных протонных сигналов или коррелированной по химическим сдвигам 2D-спектроскопии.

Описанная методика, даже в сравнительно простом исполнении только с двумя подавляющими частотами, оказалась полезной для отнесения сигналов в спектрах валиномицина, снятых для растворов в органических растворителях (см. раздел 2). На рис. 10 показано последовательное отнесение сигналов методом гетероядерного двойного резонанса. Облучение сигнала от протонов  $\text{CH}_3$  остатка  $L$ -молочной кислоты позволяет определить карбонильный сигнал  $^{13}\text{C}'$  этого остатка (рис. 10в). Мультиплетность этого сигнала  $^{13}\text{C}$  можно дополнительно снизить только при облучении протонного сигнала  $\text{C}^\alpha\text{H}$  соседнего (по направлению к C-концу) остатка. Этот эксперимент (рис. 10г) позволяет идентифицировать  $L$ -валиновый сигнал в протонном и  $^{13}\text{C}$ -спектрах. Эксперимент, приведенный на рис. 10д, позволил отнести третий карбонильный сигнал  $^{13}\text{C}'$  к остатку  $D$ -валина. Следовательно, четвертый сигнал  $^{13}\text{C}'$  принадлежит остатку  $D$ -оксиэвалериановой кислоты.

Для работы с более сложными пептидными молекулами необходимо использовать большее число облучающих частот для протонов. Соответствующая модификация ФТ-ЯМР-спектрометра приведена в [28, 30]. Калибровка радиочастотных сигналов полей подавления проведена в усло-



виях локального двойного резонанса для АХ-системы [31] путем измерения образующегося дублетного расщепления компонентов сигнала СН в спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР муравьиной кислоты при локальном одночастотном облучении сателлитов  $^{13}\text{C}$  в протонном спектре. Обычно амплитуда облучающих полей  $\gamma H_2/2\pi$  составляла около 20 Гц.

Метод гетероядерного  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -резонанса с многочастотным подавлением был применен для отнесения сигналов в спектрах ЯМР апамина при конформационном анализе этого нейротоксина медоносной пчелы в растворе (см. раздел 4.1).

Ограничения метода отнесения сигналов с помощью гетероядерного подавления очевидны. Они возникают при перекрывании наблюдаемых или облучаемых сигналов и при возможных низких значениях взаимодействия  $^3J(^{13}\text{C}'-\text{NC}^\alpha-^1\text{H})$ . В первом случае преодолеть ограничение можно, изменив положение сигнала с помощью изменения рН среды, температуры или состава растворителя. Во втором случае следует использовать взаимодействие  $^2J(^{13}\text{C}'-\text{N}-^1\text{H}) \sim 2,4-5,5$  Гц и для этого проводить более сложные эксперименты в водном растворе с применением дополнительных облучающих радиочастотных полей.

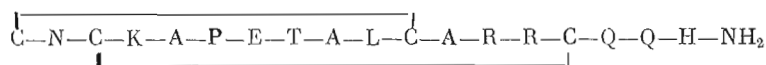
Разработка надежных методов ЯМР для однозначного отнесения сигналов служит основой конформационных исследований пептидно-белковых веществ в растворах.

#### 4. ЯМР-исследование пространственной структуры нейротоксинов

Полипептидные нейротоксины, выделенные из ядов змей, насекомых и скорпионов, обладают высокоспецифичной биологической активностью и являются важными инструментами в нейробиологических исследованиях, а также удобными моделями для изучения связи биологической функции белков с химической и пространственной структурой молекул. ЯМР-исследование [6, 7, 32] выявило, что пчелиный апамин, скорпионовый инсектотоксин I<sub>5</sub>A и «короткие» и «длинные» нейротоксины из яда кобр обладают достаточно стабильной молекулярной конформацией основной цепи, тогда как усредненная ориентация боковых цепей может меняться при различных условиях окружения. Молекулы с определенной доминирующей конформацией обычно представляют в виде фиксированной пространственной трехмерной структуры, хотя, очевидно, что в растворах молекулы подвержены некоторой степени внутренних движений.

##### 4.1. Апамин

Апамин, активный компонент яда медоносной пчелы *Apis mellifera*, — октадекапептид с двумя дисульфидными связями:



Это наименьший из известных пептидных нейротоксинов, оказывающих возбуждающее действие на центральную нервную систему, и единственный известный полипептид, проникающий через мембраны мозга [33, 34]. Апамин широко используется для изучения передачи нервного импульса [35—37].

Общая конформационная стабильность молекулы апамина следует из спектров КД [38], изучение которых показывает, что ее структура имеет высокое содержание правой  $\alpha$ -спирали и устойчива при изменении в широком диапазоне рН водного раствора, в присутствии органических растворителей и денатурирующих агентов (6 М гуанидинийхлорида) и даже химической модификации. Протонные и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектры также свидетельствуют о стабильной структуре основной цепи апамина. Спектроскопия ЯМР использована как основной метод для определения трехмерной структуры этой молекулы [6, 7, 39, 40, 41].

Сигналы в протонных спектрах при 300 МГц и в  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектрах

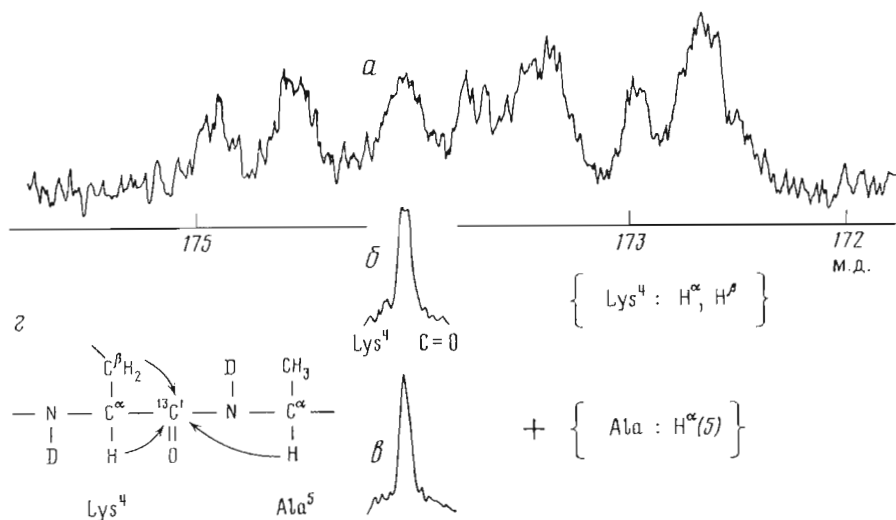


Рис. 11. Карбонильная область  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра при 75 МГц 0,05 М раствора апамина в  $^2\text{H}_2\text{O}$  (ФТ-ЯМР-спектрометр типа Varian SC-300, рН\* 6,75; 32° С): *a* – спектр без развязки; *b* – с развязкой при облучении протонов  $\text{H}^\alpha$  и  $\text{H}^\beta$  остатка  $\text{Lys}^4$ ; *в* – при дополнительном облучении слабополюсного  $\text{H}^\alpha$ -резонанса одного из аланиновых остатков; *г* – спин-спиновые взаимодействия карбонильного  $^{13}\text{C}'$ -атома остатка  $\text{Lys}^4$  во фрагменте апамина

при 75 МГц апамина идентифицированы на двух уровнях отнесения в одномерной спектроскопии с помощью методов, описанных в разделе 3. Например, отнесение сигналов одного из трех остатков аланина ( $\text{Ala}^5$ ,  $\text{Ala}^6$  и  $\text{Ala}^{12}$ ) выполнено следующим образом. На первом уровне отнесения четырехпротоновые спиновые системы аланиновых остатков были выделены методом гомоядерного двойного резонанса. На втором уровне отнесения для выявления системы остатка  $\text{Ala}^5$  было использовано то обстоятельство, что соседний остаток  $\text{Lys}^4$  – единственный остаток с данным типом спиновой системы, и поэтому его сигналы отнесены однозначно путем последовательного двойного резонанса. Если теперь  $\text{H}^\alpha$ - и  $\text{H}^\beta$ -лизиновые резонансы одновременно облучить частотами  $\nu_1$  и  $\nu_2$ , то один из карбонильных сигналов в  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектре сужается с появлением дублетного расщепления (рис. 11б). Очевидно, что этот  $^{13}\text{C}'=\text{O}$ -сигнал принадлежит лизиновому остатку вследствие наблюдаемого подавления спин-спинового взаимодействия через две и три химические связи с протонами  $\text{H}^\alpha$  и  $\text{H}^\beta$ . Остаточное расщепление обусловлено взаимодействием этого ядра  $^{13}\text{C}'$  с протоном  $\text{H}^\alpha$  соседнего остатка  $\text{Ala}^5$ . Рассматриваемый карбонильный сигнал сужается (рис. 11в) до синглета, если дополнительную частоту  $\nu_3$  облучения настроить на резонанс аланинового протона  $\text{H}^\alpha$ , который находится в самом слабом поле. Это доказывает, что облучаемый протон  $\text{H}^\alpha$  принадлежит спиновой системе остатка  $\text{Ala}^5$ .

С помощью этого метода все другие протонные сигналы (рис. 12) и большинство сигналов  $^{13}\text{C}'$  пептидных карбониллов (рис. 13) в спектрах апамина были отнесены в соответствии с его аминокислотной последовательностью [39]. Соотнесение параметров протонных сигналов с определенным аминокислотным остатком представлено в табл. 1. Приведенное здесь отнесение сигналов в основном базируется на результатах работ [6, 7, 30, 40, 41] с учетом недавно полученного уточнения отнесения для остатков 10, 13, 16 и 17, выполненного с помощью 2D-ЯМР-спектроскопии при 360 МГц [42].

Приведенные в табл. 1 параметры наиболее значимы для изучения конформации апамина. Викальные константы протон-протонного взаимодействия в основной цепи  $\text{H}-\text{N}^\alpha-\text{H}$  и в боковых цепях  $\text{H}-\text{C}^\alpha\text{C}^\beta-\text{H}$  дают сведения о торсионных углах  $\phi$  и  $\chi^1$  соответственно связей  $\text{N}-\text{C}^\alpha$  и  $\text{C}^\alpha-\text{C}^\beta$  [5]. Время полуобмена ( $t_{1/2}$ ) на дейтерий позволяет выделить группы NH основной цепи, связанные водородными связями [43]. Кроме того,

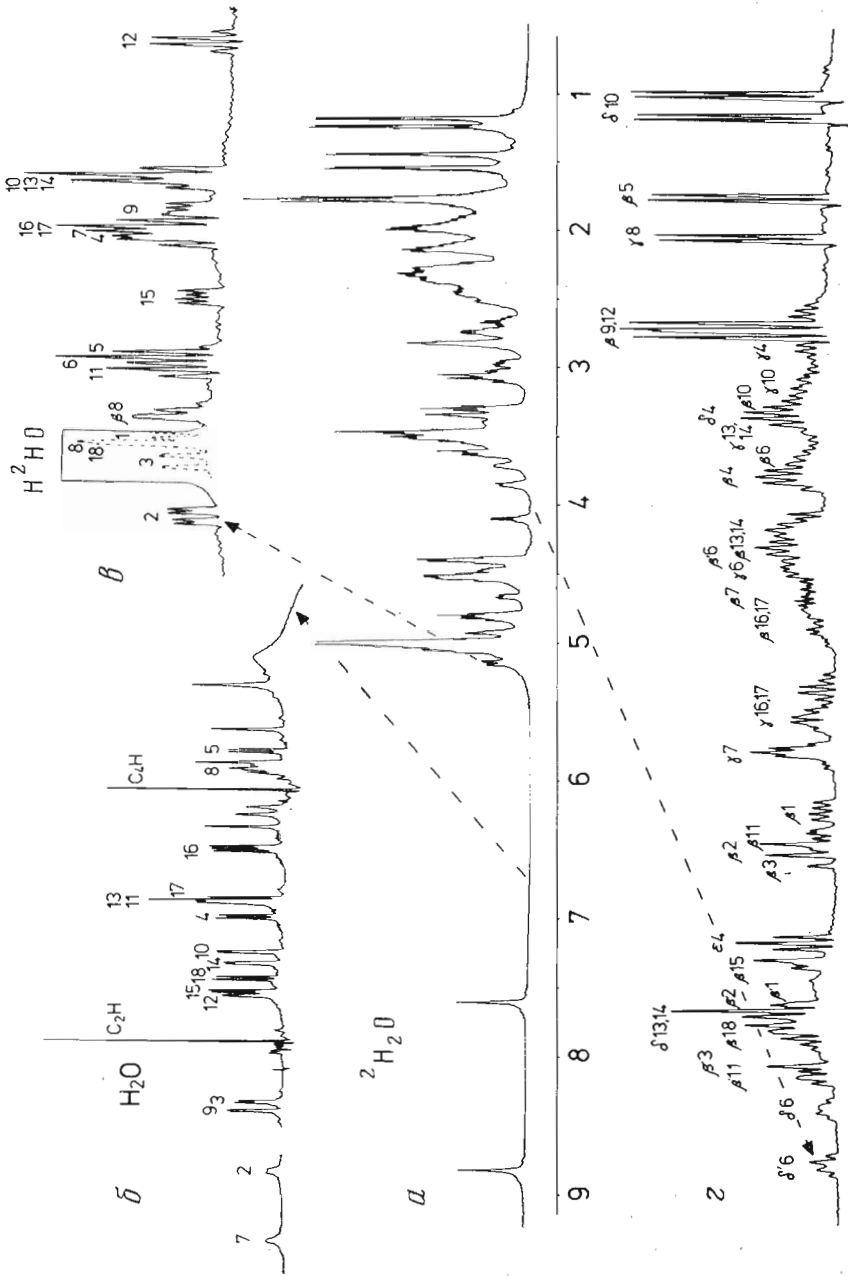


Рис. 12. Протонный ЯМР-спектр при 500 МГц водного раствора 0,01 М амина (ФТ-ЯМР-спектрометр типа Bruker WM-500, рН 5,0; 32° С): *a* — общий спектр в  $^2\text{H}_2\text{O}$ ; *b* — низкочастотная область амидных NH-сигналов в  $\text{H}_2\text{O}$ ;  $\beta$  — область  $\text{C}^\alpha\text{H}$ -сигналов в  $^2\text{H}_2\text{O}$ ; сигналы, закрытые кривыми полосой воды, выявлены при изменении температуры;  $\delta$  — сильнопольная область в  $^2\text{H}_2\text{O}$ . Последние две области зарегистрированы с использованием ЭВМ-программы повышения разрешения. Нумерация сигналов соответствует положению соответствующих аминокислотных остатков в первичной структуре амина. Греческие буквы отвечают положению соответствующего углеродного атома в боковой цепи остатка



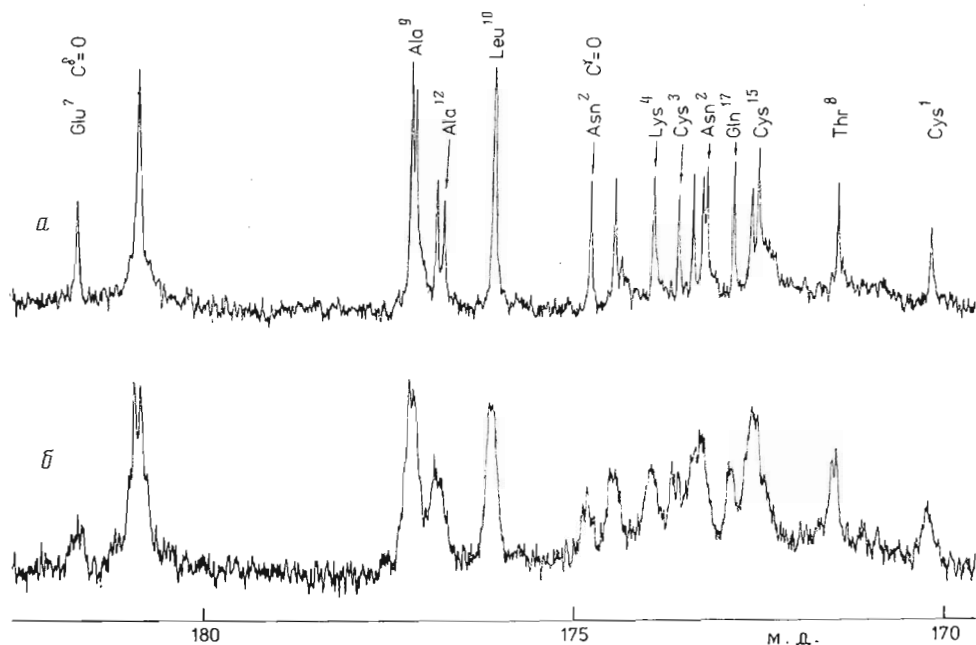


Рис. 13. Отнесение карбонильных сигналов в  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектре при 75 МГц раствора 0,05 М апамина в  $^2\text{H}_2\text{O}$  (ФТ-ЯМР-спектрометр типа Varian SC-300, рН\* 6,75; 32° С): а – при шумовой развязке; б – без развязки

рН-зависимость химических сдвигов, изученная в работах [6, 40, 41], характеризует молекулярное микроокружение ионогенных групп: N-концевой  $\alpha$ -аминогруппы,  $\epsilon$ -аминогруппы лизина-4,  $\gamma$ -карбонильной группы глутаминовой кислоты-7 и имидазольного кольца гистидина-18. Значения  $pK_a$   $\alpha$ -аминогруппы (6,7) и гистидина-18 (6,6) слишком близки, чтобы различить их для ряда слабых зависимостей химических сдвигов от рН. Поэтому был использован химически модифицированный апамин с блокированной  $\alpha$ -аминогруппой ([Ac-Cys<sup>1</sup>] апамин) и в результате определены сигналы, на которых отражается депротонирование гистидина-18 [40].

При анализе параметров ЯМР (табл. 1) обращает на себя внимание то, что расположенные подряд семь остатков (Ala<sup>9</sup>-Cys<sup>15</sup>) имеют низкие значения протонного спин-спинового взаимодействия Н-NC<sup>α</sup>-Н (2,9–5,9 Гц), а шесть из семи остатков во фрагменте 10–16 проявляют очень медленный дейтериевый обмен ( $t_{1/2} > 11$  ч). Обе эти особенности параметров ЯМР характерны для структуры правой спирали полипептидов ( $3_{10}$ -,  $\alpha$ - или  $\pi$ -спиралей) [43]. Поэтому было предложено, что фрагмент 10–16 встроено в спираль и группы NH( $n$ ) его основной цепи связаны водородной связью с карбонилами  $n-i$  остатков ( $i=3,4$  и 5 соответственно для  $3_{10}$ -,  $\alpha$ - и  $\pi$ -спиралей). При построении модели было найдено, что только  $\alpha$ -спиральная структура удовлетворяет ограничениям, накладываемым дисульфидными связями 1–11 и 3–15. Присутствие правого  $\alpha$ -спирального фрагмента в апаине подтверждается спектрами КД [38] и комбинационного рассеивания света [44], а также методом предсказания вторичной структуры [45] по Чоу и Фасману [46].

Построение модели на основе  $\alpha$ -спирального фрагмента для остатков 6–16 позволяет образовать  $\beta$ -изгиб, состоящий из остатков 2–5, который объясняет медленный дейтерообмен группы NH остатка Ala<sup>5</sup>. При создании модели пространственной структуры апамина [39], приведенной на рис. 14, также были приняты во внимание следующие основные результаты ЯМР-исследования [6, 40]:

а) карбоксильная группа остатка Glu<sup>7</sup> находится на расстоянии  $\sim 5$  Å от N-концевой  $\alpha$ -аминогруппы;

Параметры протонных ЯМР-сигналов аламина

Аминокислотный остаток	$J_{\text{HN}\alpha\text{H}}$ , Гц	$J_{\text{HC}\alpha\text{H}}$ , Гц	$J_{\text{HC}\beta\text{H}}$ , Гц	$t_{1/2}$ , ч	Наблюдаемые рН-зависимости химических сдвигов **		
					Основная цепь NH (в H <sub>2</sub> O)	$\alpha\text{H}$ (в H <sub>2</sub> O)	Боковая цепь CH (в H <sub>2</sub> O)
Cys <sup>1</sup>	—	—	7,8; 7,8	—	0,70 ( $\alpha\text{N}$ )	C <sup><math>\beta</math></sup> : 0,04 (Glu); 0,29 ( $\alpha\text{N}$ )	
Asn <sup>2</sup>	9,5	—	11,2; 4,2	<0,1	-1,47 (Glu); 0,77 ( $\alpha\text{N}$ )	0,03 (Glu); 0,04 ( $\alpha\text{N}$ )	
Cys <sup>3</sup>	5,2	—	11,9; 2,8	0,2	0,02 (Glu); 0,42 ( $\alpha\text{N}$ )	-0,02 (Glu); 0,02 ( $\alpha\text{N}$ )	
Lys <sup>4</sup>	7,6	—	—	4	0,04 (Glu); -0,03 ( $\alpha\text{N}$ )	C <sup><math>\delta</math></sup> : 0,23 (Lys); C <sup>*</sup> : 0,43 (Lys)	
Ala <sup>5</sup>	6,8	—	6,1	11	0,07 (Glu); -0,09 ( $\alpha\text{N}$ )	C <sup><math>\beta</math></sup> : 0,03 (Glu); -0,01 ( $\alpha\text{N}$ )	
Pro <sup>6</sup>	—	—	6,2; 6,2	—	—	C <sup><math>\gamma</math></sup> : 0,14 (Glu); 0,06 ( $\alpha\text{N}$ )	
Glu <sup>7</sup>	6,9	—	9,6; 4,4	0,1	-1,64 (Glu); 0,61 ( $\alpha\text{N}$ )	C <sup><math>\gamma</math></sup> : 0,03 (Glu)	
Thr <sup>8</sup>	8,5	—	1,9	4	0,22 (Glu); -0,06 ( $\alpha\text{N}$ )	C <sup><math>\delta</math></sup> : не зависит	
Ala <sup>9</sup>	2,7	—	6,1	<0,1	-0,04 (Glu); 0,07 ( $\alpha\text{N}$ )	C <sup><math>\beta</math></sup> : не зависит	
Leu <sup>10</sup>	4,2	—	—	>100	-0,04 (Glu); 0,05 ( $\alpha\text{N}$ )	C <sup><math>\delta</math></sup> : не зависит	
Cys <sup>11</sup>	5,9	—	7,6; 7,6	14	-0,17 (Glu); -0,04 ( $\alpha\text{N}$ )	C <sup><math>\beta</math></sup> : -0,03 (Glu); 0,02 ( $\alpha\text{N}$ )	
Ala <sup>12</sup>	3,0	—	6,1	26	0,07 (Glu); 0,02 ( $\alpha\text{N}$ )	C <sup><math>\delta</math></sup> : не зависит	
Arg <sup>13</sup>	5,5	—	—	20	0,08 (Glu)	C <sup><math>\gamma</math></sup> : не зависит	
Arg <sup>14</sup>	3,5	—	9,6; 4,2	2,7	-0,06 (Glu)	C <sup><math>\gamma</math></sup> : 0,08 (His)	
Cys <sup>15</sup>	5,4	—	—	26	He зависит	C <sup><math>\delta</math></sup> : 0,97 (His); C <sub>4</sub> : 0,3 (His)	
Gln <sup>16</sup>	6,8	—	—	11	0,03 (Glu); -0,01 (His)	—	
Gln <sup>17</sup>	7,1	—	—	0,5	0,16 (His)	—	
His <sup>18</sup>	7,9	—	8,6; 6,1	<0,1	0,04 (Glu); 0,20 (His)	—	

\* Время полуобмена на дейтерий для NH-групп основной цепи при рН 2,9 и 14° С.

\*\* Химические сдвиги в м.д.; положительные значения отвечают смещению в сильное поле при возрастании рН. Символ в скобках указывает на то, что рН-зависимость химического сдвига имеет точку перегиба при значении рН, соответствующем рК<sub>a</sub> α-амино группы N-концевого аминокислотного остатка (рК<sub>a</sub> 6,7), карбоксильной группы Glu<sup>7</sup> (рК<sub>a</sub> 3,6), имидазольного кольца His<sup>18</sup> (рК<sub>a</sub> 6,6) и ε-аминогруппы Lys<sup>4</sup> (рК<sub>a</sub> 10,8).

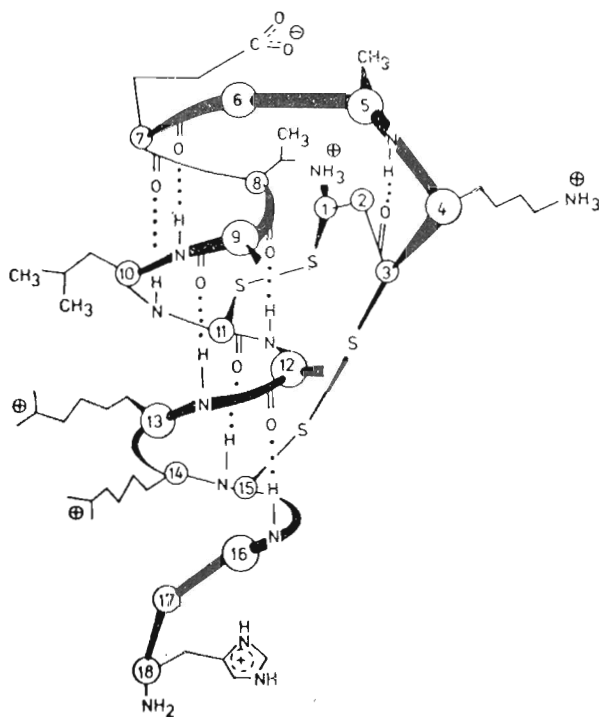


Рис. 14. Предложенная пространственная структура апамина *Apis mellifera* в растворе

б) карбоксильная группа остатка Glu<sup>7</sup> сближена также с метильными группами остатков Ala<sup>5</sup> и Thr<sup>8</sup>;

в) боковая группа по крайней мере одного из аргининовых остатков сближена с метильной группой Leu<sup>10</sup>;

г) ε-аминогруппа остатка Lys<sup>4</sup> находится вдали от других остатков;

д) боковые цепи His<sup>18</sup> и обоих аргининовых остатков удалены от других ионогенных групп;

е) группы NH основной цепи остатков Lys<sup>4</sup> и Thr<sup>8</sup> могут образовывать слабые водородные связи, по-видимому, с функциональными группами боковых цепей молекулы;

ж) значения торсионных углов φ построенной структуры должны согласовываться с измеренными vicинальными константами взаимодействия  $^3J(\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H})$  и  $^3J(^{13}\text{C}'-\text{NC}^\alpha-\text{H})$ .

Кроме того, спектры комбинационного рассеивания света [44] показали сходство конформационного строения обоих дисульфидных мостиков — 1–11 и 3–15. На основе закономерностей [47] предложена *транс-гош-гош-гош-транс*-ориентация фрагмента  $\text{C}^\alpha-\text{C}^\beta-\text{S}-\text{S}-\text{C}^\beta-\text{C}^\alpha$ .

Торсионные углы φ основной цепи (рис. 14) были определены по константам взаимодействия  $^3J(\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H})$ , а неопределенность в их значениях была частично устранена по константам  $^3J(^{13}\text{C}'-\text{NC}^\alpha-\text{H})$  (см. раздел 1) [20, 40]. Энергетическая φ-φ-карта Рамачандрана показывает, что соответствующие точки для остатков апамина находятся в разрешенных областях.

Жесткость конформации апамина достигается соответствующей ориентацией α-спирали 6–16, β-изгиба 2–5 и дисульфидных мостиков 1–11 и 3–15. Дополнительные, слабые внутримолекулярные водородные связи могут быть образованы между группой NH основной цепи лизина-4 и карбонильной группой боковой цепи аспарагина-2, а также между группой NH основной цепи треонина-8 и кислородом гидроксила этого же остатка или карбонилем основной цепи остатка аланина-5. Только C-концевые остатки глутаминовой кислоты-17 и гистидина-18 не включены в третичную структуру апамина.

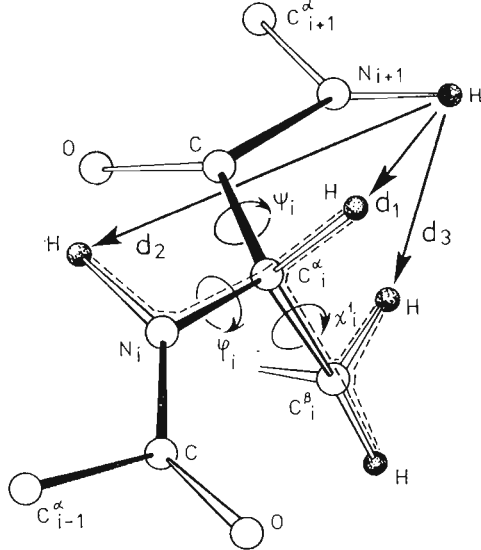


Рис. 15. Конформационные параметры ЯМР в пептидном фрагменте. Стрелки означают дипольное взаимодействие между протонами соседних остатков для амидного  $\text{NH}_{i+1}$ -протона с  $\text{C}^{\alpha}\text{H}_i(d_1)$ , амидным  $\text{NH}_i(d_2)$ - и  $\text{C}^{\beta}\text{H}_i(d_3)$ -протонами. Пунктирные линии показывают вицинальные спин-спиновые скалярные взаимодействия  ${}^3J(\text{H}-\text{NC}^{\alpha}-\text{H})$  и  ${}^3J(\text{H}-\text{C}^{\alpha}\text{C}^{\beta}-\text{H})$  между протонами одного остатка

Пространственная структура апамина в растворе (рис. 14) согласуется со спектральными данными [6, 38–42, 44] значительно лучше, чем структуры, предложенные исходя из расчета конформационной энергии в атомном [48] и псевдоатомном [49] представлении, а также на основе предсказания вторичной структуры [45, 50].

Эту конформацию апамина в растворе можно считать аналогичной конформации, принимаемой молекулой на рецепторе, так как она устойчива к условиям среды и химической модификации. Синтетический апамин обладает полной биологической активностью [51–56] и характеризуется такими же спектрами КД и ЯМР [56], как и природное вещество, что рассматривается [45] как свидетельство того, что информация о правильном свертывании пептидной цепи заложена именно в этой цепи, а не в предшественнике апамина.

Однако общая устойчивость пространственной структуры не является единственным свойством, существенным для биологической активности. Также важна химическая структура боковых цепей аргининовых остатков [38, 57], что следует из очень сильного снижения биологической активности при замещении обоих остатков аргинина (13 и 14) на лизиновые [34, 58, 59] или орнитиновые [36, 53] остатки.

Дальнейший прогресс в изучении структурно-функциональных соотношений для апамина определяется возможностью локализации и выделения рецепторной системы и исследования ее взаимодействия с апамином и его производными.

#### 4.2. Инсектотоксин $I_5A$

Из яда кавказского подвида скорпиона *Buthus eupeus* выделено 12 различных нейротоксинов [60]. Один из них, инсектотоксин  $I_5$ , обладает паралитической активностью для насекомых, возможно, благодаря воздействию на глутаматный рецептор постсинаптической мембраны [61]. Этот инсектотоксин и его изотоксин  $I_5A$  [39, 62] принадлежат гомологическому семейству «коротких» инсектотоксинов [63], содержащих 35–36 аминокислотных остатков и четыре дисульфидные связи. Следует подчеркнуть, что положение дисульфидных мостиков не установлено.

Пространственная структура инсектотоксина  $I_5O$  в растворе определена путем широкого применения 2D-ЯМР-спектроскопии. С использованием спектров типа COSY и SECSY, коррелированных по скалярным спин-спиновым взаимодействиям, и особенно спектров NOESY, коррелированных по дипольным взаимодействиям, практически все сигналы отнесены к определенным аминокислотным остаткам первичной структуры [39, 62, 64, 65]. В этих исследованиях применена новая схема совместной



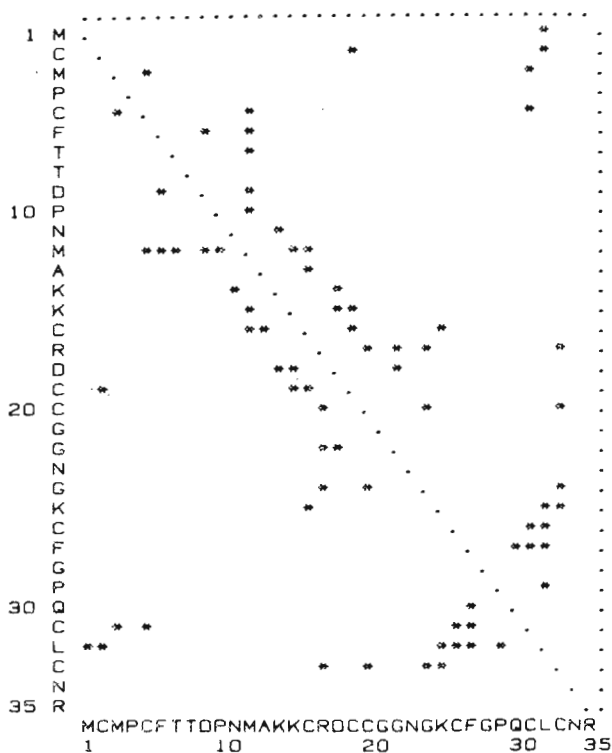


Рис. 17. Идентифицированные по ЯЭО контакты между протонами аминокислотных остатков инсектотоксина I<sub>5</sub>A, удаленных по его первичной структуре

ных фрагментов полипептидной цепи следует ожидать последовательные ЯЭО с  $d_2$ -кросс-пиками без  $d_1$ -пиков (за исключением глицинового остатка). Напротив, для  $\beta$ -структуры характерно присутствие  $d_1$ -пиков и отсутствие  $d_2$ -взаимодействий. Пики  $d_3$ , как правило, отсутствуют в параллельной  $\beta$ -структуре.

Если проанализировать с этой точки зрения наблюдаемые  $d$ -взаимодействия в инсектотоксине I<sub>5</sub>A (рис. 16), то оказывается что  $\alpha$ -спиральный фрагмент простирается от 11-го до 19-го остатка инсектотоксина I<sub>5</sub>A.  $\beta$ -Структура проявляется на участках 23—27 и 30—34. Поскольку два последних фрагмента находятся рядом в полипептидной цепи, можно полагать, что они составляют антипараллельную  $\beta$ -структуру с  $\beta$ -изгибом, образованным остатками 28 и 29. Данные КД и спектров комбинационного рассеивания света также указывают на присутствие  $\alpha$ -спиральных и  $\beta$ -структурных участков вторичной структуры инсектотоксина I<sub>5</sub>A.

Построение детальной трехмерной структуры соответствующих участков регулярной вторичной структуры основано на анализе данных ЯМР

Таблица 3

Экстремальные расстояния  $d_1$ ,  $d_2$  и  $d_3$  (Å) в пептидном фрагменте (рис. 15) для регулярных элементов вторичной структуры ( $\alpha$ -спираль  $\alpha_R$ , параллельная  $\beta_R$  и антипараллельная  $\beta_A$  структуры) и неупорядоченной структуры

Расстояние	$\alpha_R$ -Спираль	$\beta_R$ -Структура	$\beta_A$ -Структура	Неупорядоченная структура
$d_1$	3,5—3,6 *	2,2—2,3	2,2—2,4	2,2—3,6 **
$d_2$	2,4—3,3	3,8—4,6	3,9—4,5	1,4—4,7
$d_3$	2,1—4,1	3,2—4,6	2,7—4,4	1,3—4,7

\* Диапазон  $d_1$  для глицинового остатка в  $\alpha$ -спиральной структуре составляет 2,6—3,0 Å.

\*\* Для остатка глицина максимальное расстояние  $d_1$  равно 3,3 Å.

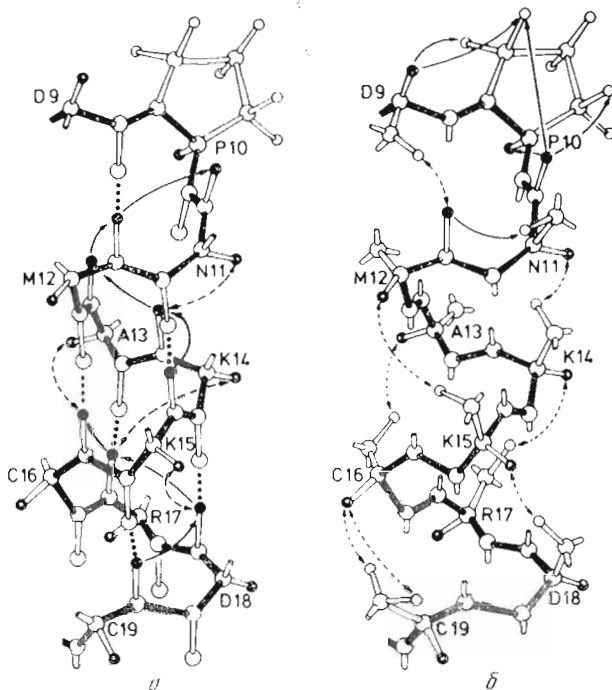


Рис 18. Конформация  $\alpha$ -спирали фрагмента 9–19 молекулы инсектотоксина  $I_5A$  *B. eipreus*. Стрелки отвечают межпротонным ЯЭО-взаимодействиям (а) между протонами NH и  $C^\alpha H$  основной цепи и (б) между протонами основной и боковых цепей. Сплошные и штриховые стрелки означают дипольные взаимодействия протонов соответственно в соседних (см. рис. 15) и несоседних остатках. Ряды из четырех точек показаны водородные связи между остатками: для участвующих групп NH наблюдается очень медленный обмен на дейтерий в растворе  $^2H_2O$  ( $t_{1/2}$  от 38 до  $>100$  ч при  $pH^* 2,7$  и  $32^\circ C$ )

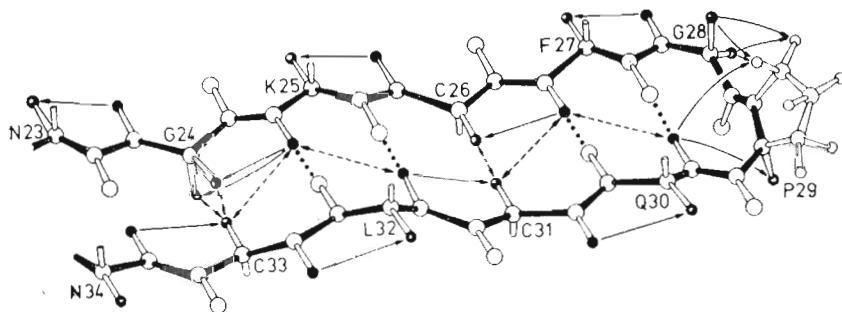


Рис. 19. Конформация антипараллельной  $\beta$ -структуры фрагмента 23–24 инсектотоксина  $I_5A$  *B. eipreus*. Обозначения объяснены в подписи к рис. 18;  $t_{1/2} > 100$  ч

об участвующих во внутримолекулярных водородных связях NH-групп основной цепи, о торсионных углах, найденных по константам спин-спинового вицинального взаимодействия, и об ЯЭО-взаимодействии между протонами несоседних остатков (рис. 17) [39, 64, 65]. Вицинальные константы  $^3J(H-C^\alpha C^\beta-H)$  были выделены с помощью протонных  $J$ -разрешенных 2D-спектров [39, 65].

Фрагмент инсектотоксина 9–19 (рис. 18) содержит сочетание  $\beta$ -изгиба 9–12 типа I и правую  $\alpha$ -спираль 12–19. Характерными для  $\alpha$ -спиральной структуры являются «дальние» ЯЭО-константы  $C^\alpha H$ -протона  $i$ -го остатка с NH- и  $C^\beta H$ -протонами  $i+3$ -го остатка. Следует также подчеркнуть, что константы взаимодействия  $^3J(H-NC^\alpha-H)$  во фрагменте 9–19 согласуются с углами  $\phi$  этой структуры. Например, остатки, принимающие участие в образовании  $\alpha$ -спиральной конформации, имеют значения констант  $^3J$  в пределах 2,4–5,0 Гц, которые отвечают углам  $\phi -70 \pm 10^\circ$  [5]. Неоднозначность соотношения между константой  $^3J$  и углом  $\phi$  устранена путем учета результатов по ЯЭО для расстояний  $d_1$ ,  $d_2$  и  $d_3$ .

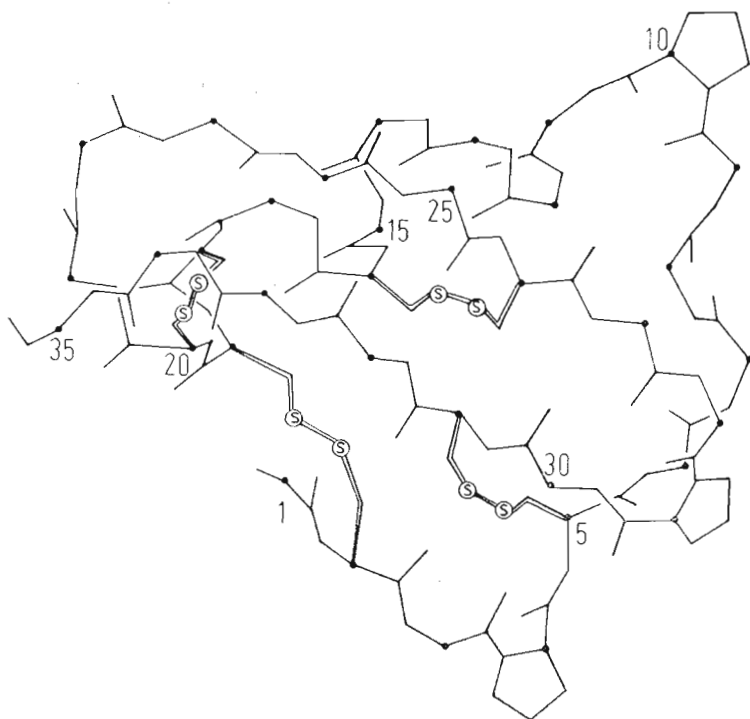


Рис. 20. Трехмерная структура инсектотоксина I<sub>5</sub>A *B. eupreus*, полученная расчетом на ЭВМ по дистанционному геометрическому алгоритму с привлечением данных ЯМР-спектроскопии

Молекулярный фрагмент 23–34 представляет собой антипараллельную  $\beta$ -структуру с  $\beta$ -изгибом в положениях 27–30 (рис. 19). Кроме того, обнаружено несколько протонных ЯЭО-взаимодействий между боковыми цепями, существенных только для антипараллельной  $\beta$ -структуры. Например, ароматические протоны остатка фенилаланина-27 связаны дипольным взаимодействием с протонами боковых цепей и групп NH основной цепи остатков лейцина-32 и изолейцина-25. Константы взаимодействия  $^3J(\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H})$  7,0–10,1 Гц для остатков 25–27 и 30–33 также согласуются с углами  $\varphi -140 \pm 15^\circ$  [5]  $\beta$ -структуры фрагмента.

Конструирование полной конформации молекулы инсектотоксина I<sub>5</sub>A [39, 64, 65] (рис. 20) проведено на ЭВМ по дистанционному геометрическому алгоритму [70], который строит в декартовых координатах пространственную структуру, удовлетворяющую ограничениям по межкатоным расстояниям. Последние определяются ковалентной структурой молекулы и экспериментальными данными ЯМР по константам спин-спинового взаимодействия вицинальных протонов и ЯЭО-контактами между протонами соседних и удаленных по полипептидной цепи аминокислотных остатков. Результат этого анализа должен согласовываться также с требованием, чтобы медленно обменивающиеся с растворителем водороды NH-групп участвовали в образовании внутримолекулярных водородных связей или были хорошо экранированы от контактов со средой.

К сожалению, при конформационном анализе инсектотоксина I<sub>5</sub>A нельзя было воспользоваться данными о положении дисульфидных связей, поскольку их не удавалось определить химическими методами [61, 62]. Эту проблему с высокой степенью достоверности удалось решить путем детализации конформационных возможностей построенной трехмерной структуры молекулы. Статистический анализ всех возможных вариантов образования дисульфидных связей показал, что наиболее вероятным является образование S–S-мостиков между остатками 2–19, 5–31, 16–26-



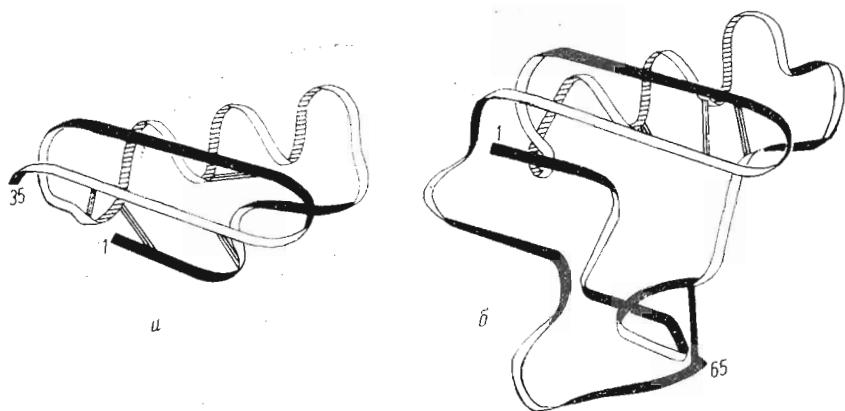


Рис. 21. Сравнение укладки основной цепи скорпионовых токсинов «короткого» (а) и «длинного» (б) типов. а — строение инсектотоксина I<sub>5</sub>A *B. eupreus* в растворе по данным ЯМР, б — строение в кристалле по рентгеноструктурному анализу токсина v-3 *Centruroides sculpturatus* Ewing, перерисованное из [71]

и 20–33 [39, 64, 65]. Впоследствии две из этих связей (2–19 и 5–31) были подтверждены химическим анализом\*.

В заключение представляет интерес сопоставить (рис. 21) найденную структуру «короткого» инсектотоксина I<sub>5</sub>A в растворе с недавно полученной методом рентгеноструктурного анализа кристаллической структурой скорпионового токсина v-3 «длинного» типа (65 аминокислотных остатков), выделенного из *Centruroides sculpturatus* Ewing [71]. Несмотря на отсутствие гомологии в аминокислотной последовательности и различие в биологическом действии [63], пространственные структуры этих токсинов скорпиона содержат ряд сходных черт. Оба токсина имеют  $\alpha$ -спиральные фрагменты и антипараллельную  $\beta$ -структуру с примерно одинаковым числом аминокислотных остатков. Более того, эти фрагменты упакованы в пространстве сходным образом. Однако токсин v-3 содержит дополнительные 30 остатков, находящихся в N- и C-концевых участках молекулы. Полагают [71], что именно эти участки «длинных» токсинов отвечают за их биологическое действие. Поэтому возможно, что структурное сходство «коротких» и «длинных» токсинов скорпиона по крайней мере не прямо связано с их механизмом действия. По-видимому, эти типы токсинов имеют одного и того же предшественника, но находятся на разных стадиях процесса эволюции.

#### 4.3. Нейротоксины змей

Наиболее разработанной, хотя все еще далекой от полного завершения, является взаимосвязь структуры и функции для нейротоксинов ядов змей, обладающих активностью, сходной с действием кураре [72]. В основном это обусловлено доступностью солубилизированной формы мишени действия нейротоксинов — ацетилхолинового рецептора, выделяемого из постсинаптических мембран нейромышечного контакта [73, 74]. Более того, имеется широкий набор гомологов нейротоксинов змей, среди них два основных класса: «короткие» нейротоксины с 60–62 аминокислотными остатками и четырьмя дисульфидными связями и «длинные» нейротоксины с 71–74 остатками и пятью дисульфидными связями [72]. Близкую гомологию с «короткими» нейротоксинами проявляют цитотоксины и кардиотоксины, обладающие, однако, другим биологическим действием.

Степень общей конформационной стабильности этих молекул была изучена по спектрам КД при различных рН, температуре и составе растворителей [75]. Было показано, что «короткий» нейротоксин наиболее устой-

\* Результаты Т. М. Волковой и Е. В. Гришина (ИБХ им. М. М. Шемякина АН СССР).

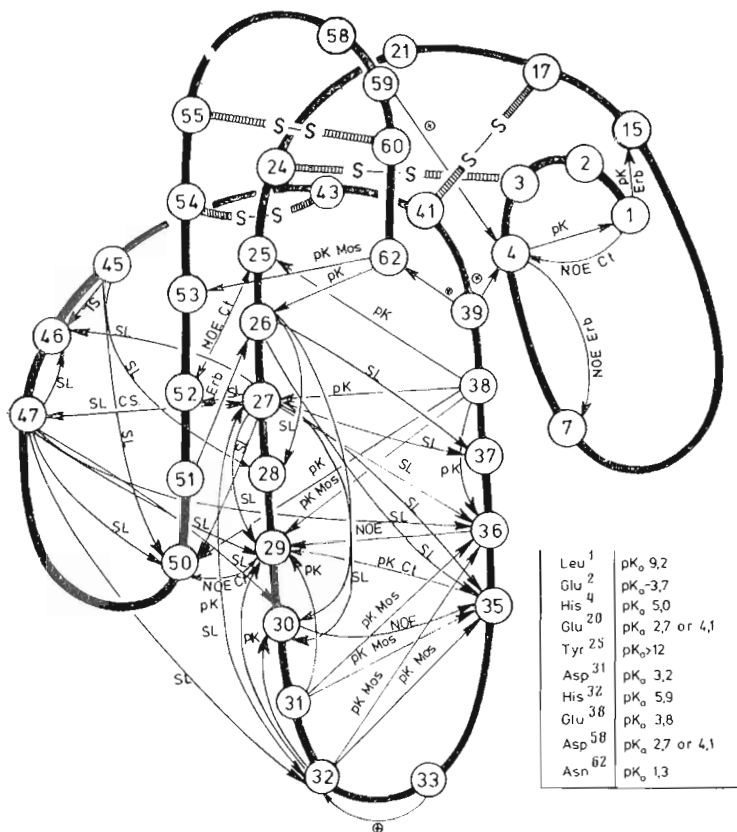


Рис. 22. Укладка основной цепи молекулы «коротких» нейротоксинов, основанная на ЯМР-исследовании нейротоксина II *Naja naja oxiana* [7, 85]. Дополнительные «контакты», найденные методом ЯМР для других «коротких» нейротоксинов, обозначены следующим образом: Mos – нейротоксин III *Naja mossaibica mossaibica* [83], Erb – эрабутоксин в *Lalicauda semifasciata* [98–100] и Ct – кобротоксин *N. n. atra* [95]. Сокращения: pK – влияние протонирования гомогенных групп на химические сдвиги, + – влияние заряда на значения pK, NOE – ядерный эффект Оверхаузера, CS – изменение химических сдвигов при химической модификации, SL – уширение от спинового меток

чив к изменению окружения, тогда как кардиотоксин и цитотоксин наименее устойчивы.

«Короткие» нейротоксины. ЯМР-исследования [6, 7, 33, 75–90] показали, что свертка основной цепи «коротких» нейротоксинов (табл. 4) в растворе весьма похожа на структуру, найденную рентгеноструктурным анализом [91–93]. На рис. 22 представлены внутримолекулярные контакты, выявленные по протонному ЯЭО [85, 88, 90], по индуцированной спиновыми метками парамагнитной релаксации [7, 79, 82, 84–88, 90] и по влиянию ионизации функциональных групп на химические сдвиги пространственно близких протонов [6, 7, 77–83, 87, 88]. Основные черты этой свертки основной цепи сохраняются в широком диапазоне pH и температуры, по крайней мере для нейротоксинов сухопутных змей [89].

Боковые цепи, конечно, могут быть подвержены внутренним движениям, особенно если они не находятся в стерически затрудненном окружении. Например, переориентация имидазольного кольца гистидина-32 наблюдается при его протонировании [7, 88] (рис. 23). При построении показанной на этом рисунке антипараллельной β-структуры центральной петли нейротоксина II *N. n. oxiana* использованы данные, полученные из спектров ЯМР двух его моноспин-меченых производных [7, 81, 82, 86, 88], а также результаты по pH-зависимостям химических сдвигов [6, 7, 76, 83, 88] (см. рис. 22) и по ЯЭО между пространственно близкими протонами [84]. В качестве примера на рис. 24 представлен разностный спектр

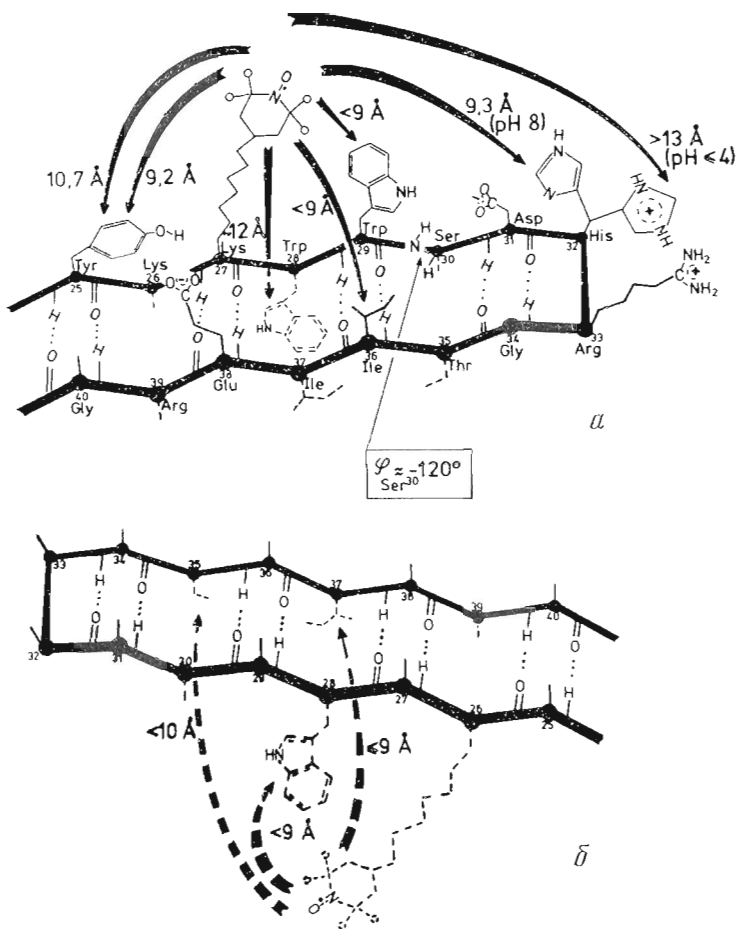


Рис 23. Конформация  $\beta$ -антипараллельной структуры центральной петли молекулы нейротоксина II *N. n. oxiana*: а - вид сверху. Расстояния между спиновой меткой (SL=1-окси-2, 2, 6, 6-тетраметилпиперидил-4-карбоксиметил-) и протонами получены по спектру ЯМР [(Lys<sup>27</sup>(SL)) NTII]; б - вид снизу. Расстояния получены для [Lys<sup>26</sup>(SL)] NTII [7, 81, 82, 86, 88]. Расстояния между N $\epsilon$ -метками на Lys<sup>26</sup> и Lys<sup>27</sup> определено по спектру диспин-меченого производного [Lys<sup>26</sup>(SL), Lys<sup>27</sup>(SL)] NTII [7, 89]

ЯЭО с импульсным облучением, в котором направленные вниз сигналы обусловлены облучением протонного резонанса  $\gamma$ -метильных групп остатка изолейцина-36. Эти сигналы отвечают ЯЭО с ароматическими протонами триптофана-29 через пространство петли, а также тривиальным ЯЭО в боковой цепи с  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -СН-протонами изолейцина-36. Сходными экспериментами обнаружены другие ЯЭО [84], которые подтверждают свертку основной цепи, показанную на рис. 22, в широком диапазоне рН водного раствора.

Недостаток экспериментов ЯЭО — ограниченный диапазон определяемых расстояний (обычно не более 5 Å [101]). Комплементарным ЯЭО-методике является метод спиновых меток, в котором спиновый парамагнетизм нитроксильного радикала воздействует на протонную релаксацию, в частности на ширину линий в диапазоне до 12–15 Å [102]. Для нейротоксина II *N. n. oxiana* получены моноспин-меченые производные по гистину-32, глутаминовой кислоте-2,  $\alpha$ -аминогруппе лейцина-1 и  $\epsilon$ -аминогруппам лизиновых остатков 15, 26, 27, 45 и 47 [79, 80, 82–89]. Протошные ЯМР-спектры этих производных были использованы для определения эффективных расстояний между спиновыми метками и протонами [7, 81, 82, 85, 86, 88, 90]. Один из примеров применения этого метода был показан на рис. 23. Другие результаты включены в общую картину топографии молекулы (рис. 22).

Таблица 4

Аминокислотные последовательности /в однобуквенном коде/ "коротких" нейротоксинов змей [72], исследованных методом ЯМР: 1 - [6, 7, 76-90], 2 - [77], 3 - [83], 4 - [94], 5 - [95-97] и 6-8 - [98-100]

	1	5	10	15	20	25			
1. Neurotoxin II, <i>N. n. oxiana</i>	L E C H N Q Q S S Q P P T T K T C S - G E T N C Y								
2. $\alpha$ -Toxin, <i>N. nigricollis</i>						P			
3. Neurotoxin III, <i>N. mossambica m.</i>	N	M A		T R	R W				
4. Neurotoxin I, <i>N. mossambica m.</i>		E		T R	G				
5. Cobrotoxin, <i>N. n. atra</i>			T	T G	G				
6. Erabutoxin a, <i>L. semifasciata</i>	R I F	H	Q		P S	S S			
7. Erabutoxin b, <i>L. semifasciata</i>	R I F	H	Q		P S	S S			
8. Erabutoxin c, <i>L. semifasciata</i>	R I F	H	Q		P S	S S			
	26	30	35	40	45	50	55	60	62
1. NTII	K K W S D H R G T I I E R G C G C P K V K P G V N L N C C R T D R C N N								
2. $\alpha$ -T	V R				T	I K	T	K	
3. NTIII	R R		Y R T		T	K I Q	H	T S	N
4. NT I	R R		Y R T		T	K I E		T	
5. Ct	R R		Y R T		S	N I E I		T	
6. Er-a	N Q		F		T	I K	S	E S E V	
7. Er-b	H Q		F		T	I K	S	E S E V	
8. Er-c	H Q		F		T	I	S	E S E V	

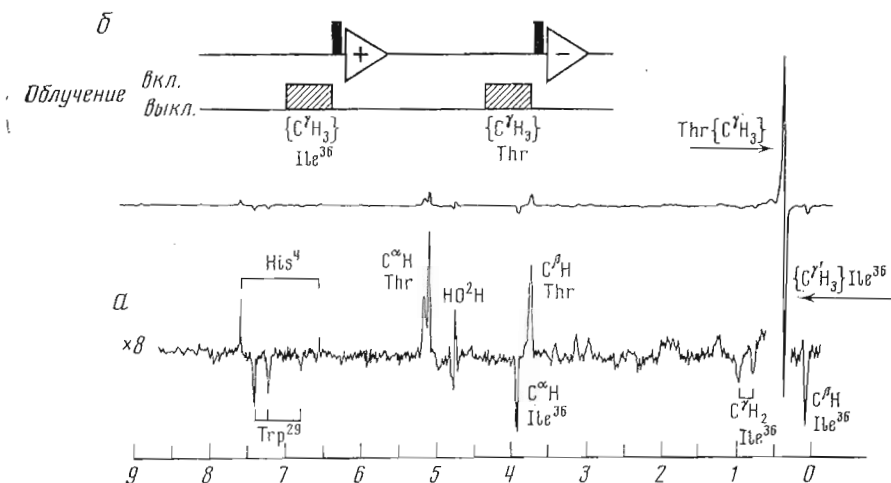


Рис. 24. *a* – разностный спектр прерванного динамического ЯЭО при 500 МГц (ФТ-ЯМР-спектрометр типа Bruker WM-500) для нейротоксина II *N. n. oxiana* (раствор 7 мМ в  $^2\text{H}_2\text{O}$ , рН\* 8,0; 25° С) при облучении  $\text{C}^{13}\text{H}_3$ -резонанса остатка изолейцина-36 (сигналы, ориентированные вниз) и  $\text{C}^{13}\text{H}_3$ -резонанса одного из треониновых остатков (сигналы, ориентированные вниз). Химические сдвиги измерены относительно 3-(триметилсилил) пропансульфоната натрия. *б* – схема импульсной последовательности, использованной при получении этого спектра. Время облучения и интенсивность радиочастотного поля составляли соответственно 0,3 с и 4 Гц

Еще одно применение спиновых меток для определения строения молекул иллюстрируется дважды мечеными производными нейротоксина, которые помогли решить ряд проблем разрешения и отнесения сигналов. Во-первых, совместно фтор- и моноспин-меченые производные нейротоксина II *N. n. oxiana* дали сведения об эффективных расстояниях между ядрами фтора и спиновыми метками, которые были найдены по ширине резонансных линий фтора [84]. Во-вторых, путем тщательной очистки продуктов соответствующих реакций были получены все 10 возможных деспин-меченых производных по  $\epsilon$ -группам лизинных остатков, которые позволили определить межспиновые расстояния [7, 79, 85, 89] по эффекту диполь-дипольного взаимодействия в ЭПР-спектрах при 77К [103]. Сохранение химически модифицированными производными интактной конформации тщательно контролировалось по спектрам КД и ЯМР. Наиболее интересные для пространственной структуры эффективные расстояния, найденные с помощью соединений с двумя ковалентными метками, приведены в табл. 5. Спектры триптофановой флуоресценции моноспин-меченых и Lys $^{27}$  (Dns)-производных дали дополнительные расстояния между остатками [105–107]. Указанные выше расстояния в растворе в целом согласуются с рентгеноструктурным строением эрабутоксина b [91–93], что указывает на адекватность нашего подхода и на устойчивость свертки основной полипептидной цепи «коротких» нейротоксинов. Некоторые расхождения (см. табл. 5) легко объяснить на молекулярной модели либо различием в первичной структуре нейротоксина II *N. n. oxiana* и эрабутоксина b *Laticauda semifasciata* (например, делецией остатка 19 в последовательности нейротоксина II), либо усреднением ориентации боковых цепей при их движении в растворе.

Несмотря на то что в целом общая структура «коротких» нейротоксинов весьма устойчива к денатурации при различных условиях, отдельные представители этого класса нейротоксинов змей могут отличаться друг от друга по степени этой стабильности. Например, эрабутоксины морских змей сильно подвержены денатурационным воздействиям и обладают более подвижной структурой, что показано ЯМР и оптической спектроскопией [100, 108, 109].

«Длинные» токсины. Наши [85, 87], а также другие [109–115] ЯМР-исследования «длинных» нейротоксинов змей (табл. 6) указывают на об-

Эффективные расстояния (Å) между боковыми цепями молекулы нейротоксина II *Naja naja oxiana* в растворе, измеренные методом репортерных групп [7] и в кристалле (в скобках), оцененные по рентгеноструктурным данным для эрабутоксина в [91–93]

Амино-кислотный остаток	Lys <sup>26</sup>	Lys <sup>27</sup>	Trp <sup>28</sup>	Trp <sup>29</sup>	Lys <sup>45</sup>	Lys <sup>47</sup>
Lys <sup>15</sup>	≥26 <sup>a</sup> (29)	18 <sup>a</sup> (15)			23 <sup>a</sup> (15)	21 <sup>a</sup> (19)
Tyr <sup>25</sup>	>13 <sup>b</sup> (18)	10 <sup>b</sup> (10)		13 <sup>b</sup> (9)	>10 <sup>b</sup> (16)	>12 <sup>b</sup> (14)
Lys <sup>26</sup>	—	20 <sup>a</sup> (22)	5 <sup>r</sup> (9)	12 <sup>b,д</sup> (16)	23 <sup>a</sup> (29)	≥26 <sup>a</sup> (26)
Lys <sup>27</sup>		—	12 <sup>b,д</sup> (18)	5 <sup>r</sup> (10)	19 <sup>a</sup> (8)	15 <sup>a</sup> (6)
Trp <sup>28</sup>			—	≥9 <sup>л</sup> (8)	9 <sup>b</sup> (25)	>11 <sup>b</sup> (19)
Trp <sup>29</sup>				—	>10 <sup>b</sup> (17)	≤8 <sup>b</sup> (11)
Lys <sup>45</sup>					—	23 <sup>a</sup> (8)

<sup>a</sup> По спектрам ЭПР диспин-меченых соединений [7, 80].

<sup>b</sup> Из протонных ЯМР-спектров моноспин-меченых соединений [7, 81, 85, 86, 88, 90].

<sup>в</sup> Из измерений эффективности переноса энергии в спектре флуоресценции α-токсина *N. nigricollis* [104].

<sup>г</sup> По тушению флуоресценции в спектрах моноспин-меченых производных [105].

<sup>д</sup> Из спектров флуоресценции моноданил-меченого производного [105].

щее сходство свертки основной цепи молекул в растворе (рис. 25) с рентгеноструктурным строением в кристалле [116, 117]. Более того, сравнение пространственной организации нейротоксинов свидетельствует о том, что «короткие» и «длинные» нейротоксины обладают общим структурным ядром (рис. 26). Оно представляет собой антипараллельную β-структуру, выделенную на рис. 26 зачерпленной полосой.

Конформационная стабильность структурного ядра «длинных» токсинов была выявлена 2D-ЯМР-спектроскопией путем наблюдения ЯЭО при разных pH водного раствора [85]. Спектры NOESY токсина *3 N. n. siamensis* при pH 2,2 и 7,5 имеют специфические кросс-пики между α-протонными резонансами и также между метильными и ароматическими протонами. ЯЭО-связи между амидными протонами NH основной цепи наилучшим образом наблюдаются при низких значениях pH, так как из-за возрастания скорости дейтерообмена при pH 7,5 только часть из ЯЭО-связей групп NH наблюдается в NOESY-спектре. На основе полученных данных построена конформация антипараллельной трехцепочечной β-структуры (рис. 27), которая, по-видимому, является общей для «длинных» нейротоксинов.

В то время как структурное ядро — антипараллельная β-структура (рис. 26) — относительно устойчиво к изменению pH, другие области «коротких» и «длинных» нейротоксинов содержат некоторые фрагменты, расположенные к конформационным переходам. Для «коротких» нейротоксинов, как было отмечено выше, конформационные изменения происходят на оконечности центральной петли [7, 81, 85, 87, 88] и в N-концевом фрагменте [84, 89, 99]. Что касается «длинных» нейротоксинов, то выявлены два основных перехода [85]: 1) в верхней петле (рис. 29), инициированный протонированием имидазольного кольца гистидина-22 в токсине *3 N. n. siamensis*; 2) в C-концевом фрагменте, обусловленный протонированием гистидина-71 в нейротоксине I *N. n. oxiana*.

Все эти переходы были отмечены в связи с протонированием гистидиновых остатков, и поскольку ни один из гистидинов не является консервативным остатком в первичной структуре гомологичных нейротоксинов змей, детали этих переходов, по-видимому, не имеют физиологического значения, но подчеркивают конформационную подвижность соответствующих участков молекул.

Когда происходит титрование имидазольного кольца гистидина-22 токсина *3 N. n. siamensis* при pK<sub>a</sub> 5,6, ясно проявляются две формы молекулы по расщеплению протонных сигналов C<sub>4</sub>H и C<sub>2</sub>H кольца (рис. 28), а также по форме других сигналов. Например [85], в ароматической области протонного резонанса две конформационные формы отражаются в разностном спектре на сигналах фенилаланинов-4 и -71 и тирозина-25, а в обла-

Таблица 6

Аминокислотные последовательности в однобуквенном коде "длинных" нейрогоксинов змей [72], исследованных методом ЯМР: 1, 2 и 4 - данная статья и [85, 87], 1 - [115], 5 - [113, 114], 5 - [111] и 6 - [114]

	1	5	10	15	20	25
1. Toxin 3, <i>N.n.iamensis</i>	IRCF---ITPDITSKDCPNG-IVCY					
2. Toxin 3, <i>N.n.naja</i>						
3. Toxin B, <i>N. naja</i>						
4. Neurotoxin I, <i>N.n.oxiana</i>	T	Y	K	T	P	I E T A P QNL
5. α-Bungarotoxin, <i>Bungarus multicinctus</i>	V	H	T	T	A I P S S A V T P E N L	
6. Toxin Ls III, <i>L.semiclaseiata</i>	R	E	Y	-	L	N P H D T Q T S Q E I
1. N.s. Tx-3	26	30	35	40	45	50 55 60 65 70 75
2. N.n. Tx-3	TKTWCDAFCSIRGKRVLDGCAATCTVK-TGVDIQCCST-DNCNPFPTKRP					
3. N.n. Tx-B	G R R R D D					
4. NTI	W GS VIE E SYQ K D H KQ					
5. α-Btx	R	M	S	V	E S K P Y E E V T K H P K Q P G	
6. Tx-Ls III	V	S	N	W	S V L E F S N T E K A K T Y	-----

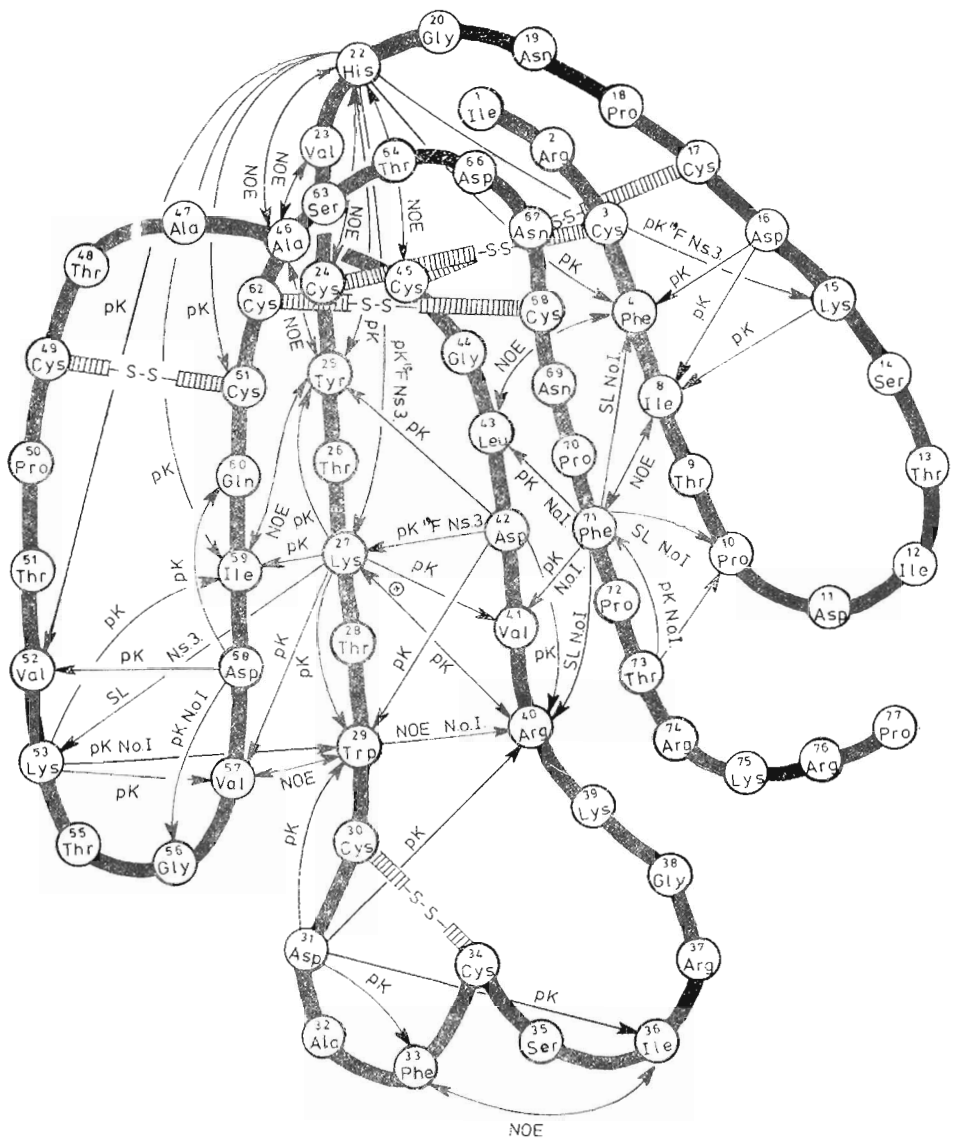


Рис. 25. Укладка основной цепи молекул «длинных» нейротоксинов, выведенная из ЯМР-исследования нейротоксина 3 *N. n. siamensis* [85, 87]. Дополнительные контакты получены из ЯМР нейротоксина I *N. n. oxiana* (No.I.) [87]. Другие обозначения — см. подпись к рис. 22

сти сильного поля — на одном из метильных резонансов валина-23. В табл. 7 собраны данные о резонансных сигналах, которые реагируют на протонирование гистидина-22 либо расщеплением линии, либо перегибом на pH-зависимости химического сдвига.

Аналогичные наблюдения были выполнены для  $\alpha$ -кобротоксина [115] и токсина В [113]. Рассматриваемый конформационный переход также отмечен для моно- и диспин-меченых производных токсина 3 *N. n. siamensis*. Например, ЭПР-спектры показывают, что боковая цепь лизина-53 меняет свое расстояние относительно спиновой метки на лизине-27 от 23 Å в кислом растворе (pH 3,5) до 18 Å при физиологическом pH 7,5 [85]. Остатки лизина-27 и -53 в «длинных» нейротоксинах соответствуют остаткам лизина-27 и -47 в «коротких» нейротоксинах (ср. табл. 4 и 6) [72]. Как отмечено выше, расстояние между спиновыми метками на лизинах-27 и -47 (15 Å) в «коротких» нейротоксинах не зависит от pH раствора (табл. 5). Таким образом, можно предположить, что данный конформа-



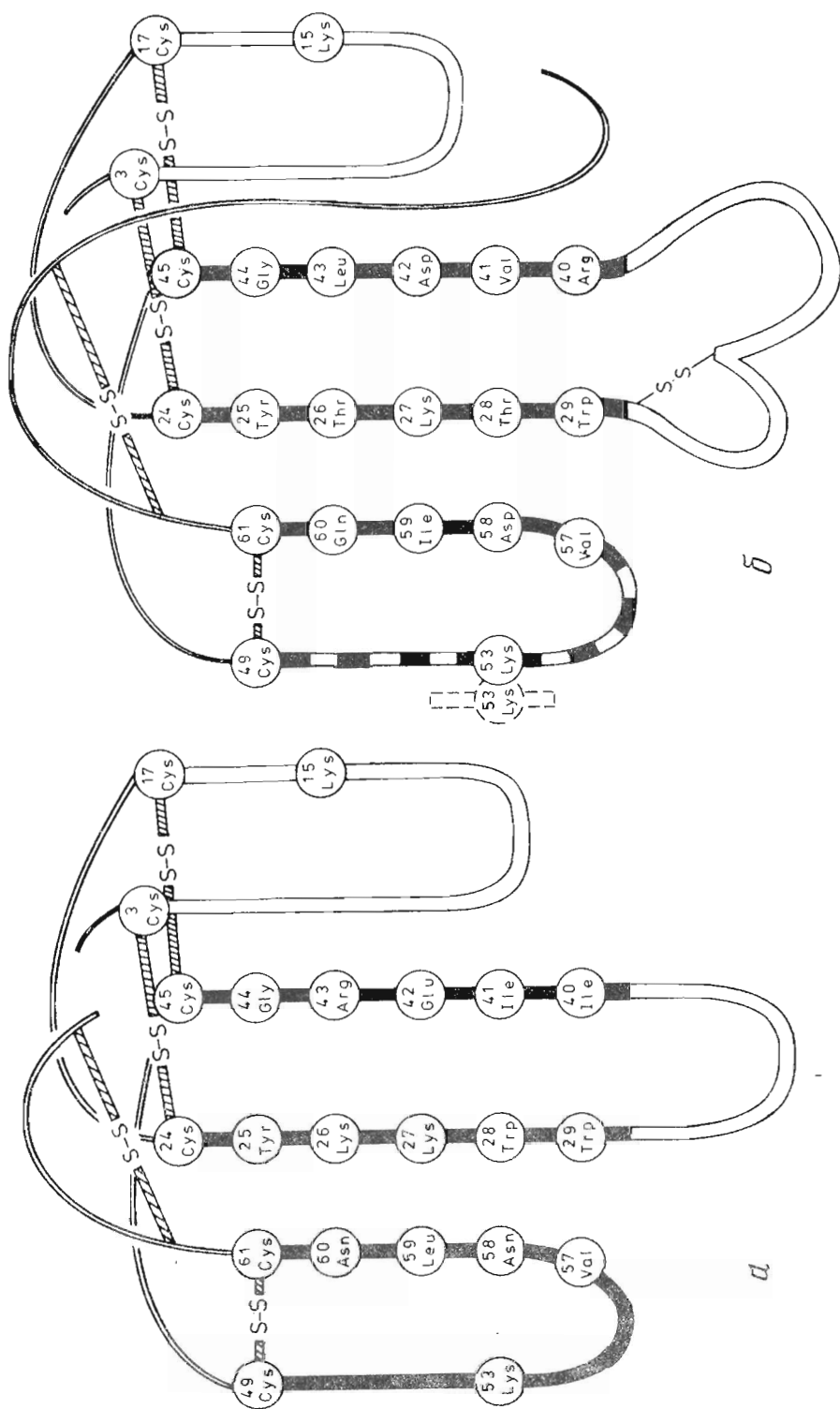


Рис. 26. Общее структурное ядро пространственной организации «коротких» (NT11 *N. n. oriana*) (а) и «длинных» (NT3 *N. n. siamensis*) нейротоксичных змей (б)

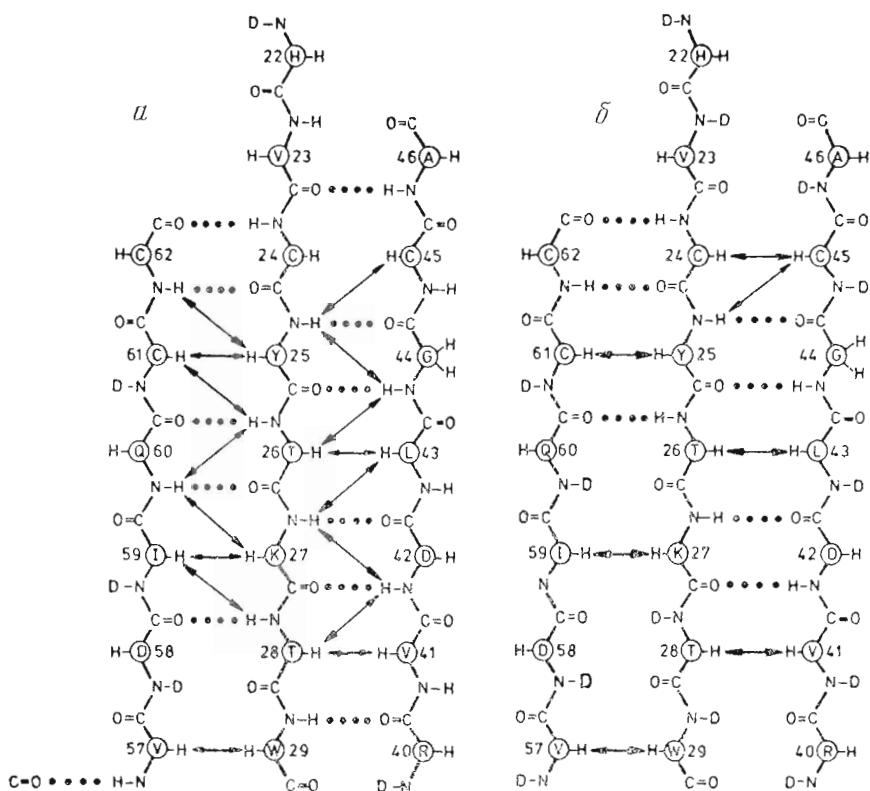


Рис. 27. Схематическое представление трехцепочечной антипараллельной  $\beta$ -структуры токсина 3 *N. n. siamensis*. ЯЭО-связи между  $\alpha$ -протонными резонансами, между протонами NH основной цепи и между  $H^{\alpha}$ - и амидными NH-протонами основной цепи отмечены стрелками согласно NOESY-спектру при pH 2,2 (а) и 7,5 (б). Водородные связи (точки) выявлены по скоростям дейтериевого обмена соответствующих амидных NH-водородов основной цепи ( $t_{1/2} > 20$  ч при pH\* 2,2 и 5–50 ч при pH\* 7,5)

ционный переход связан с трансформацией молекулы «длинного» нейротоксина в физиологически активное состояние с укорочением расстояния между лизинами-27 и -53 до 15–18 Å.

Другой конформационный переход инициируется протонированием гистидина-71 ( $pK_a$  4,5), расположенного в С-концевом фрагменте нейротоксина I *N. n. oxiana*. Этот переход обнаружен по дальнему рК-эффекту гистидина-71 на химические сдвиги метильных протонов изолейцинов-10 и -41 и лейцина-43, а также по рН-зависимости парамагнитного релаксационного эффекта в ЯМР-спектре селективно спин-меченого производного по гистидину-71 [85].

Общая природа подвижности С-концевого фрагмента подчеркивается ЯМР-исследованием гомологичного  $\alpha$ -бунгаротоксина [111], для которого найдено, что положение и стерическое окружение боковой цепи гистидина-70 зависит от температуры и подвержено конформационным изменениям при протонировании имидазольного кольца этого остатка. В связи с этим следует отметить, что исследование связывания спин-меченых «длинных» нейротоксинов с ацетилхолиновым рецептором методом ЭЛР выявило конформационные изменения именно в С-концевом участке этих нейротоксинов [85].

Локализация и наблюдаемый диапазон двух конформационных переходов «длинных» нейротоксинов представлены на рис. 29. Как видно, довольно значительная часть молекулы подвержена переходам, однако структурное ядро молекул не затрагивается, что следует из спектров ЯМР, а также подтверждено спектрами комбинационного рассеяния света [118], которые выявили, что содержание  $\beta$ -структуры не меняется при смене рН и при кристаллизации.

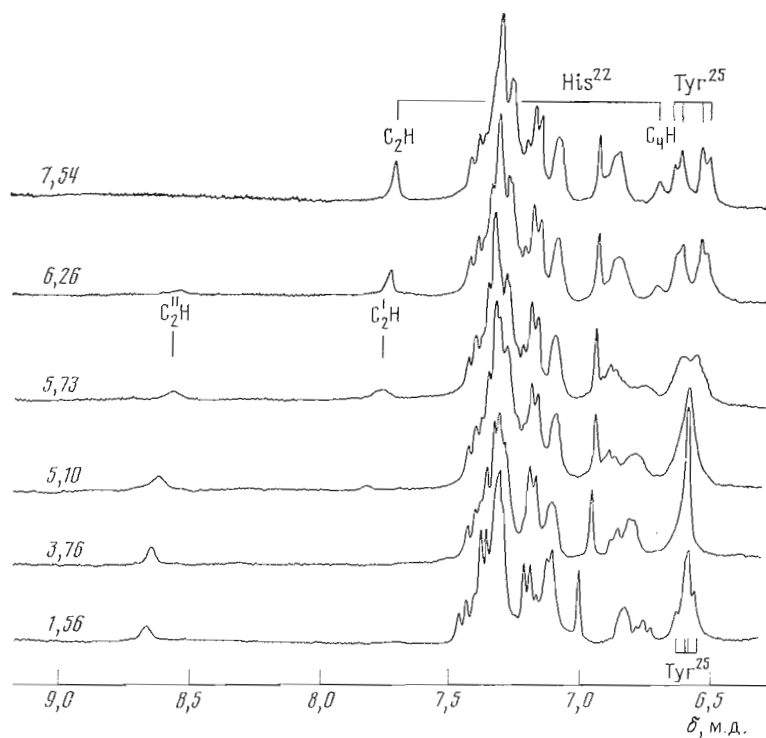


Рис. 28. Низкочастотная часть протонного ЯМР-спектра при 300 МГц токсина 3 *N. n. siamensis* при различных рН\* раствора (цифры слева) в  $^2\text{H}_2\text{O}$  (7 мМ, 32° С)

По сравнению с нейротоксинами змей «короткого» типа молекулы «длинных» нейротоксинов имеют более обширные участки, предрасположенные к конформационным переходам при изменении окружающих условий. Это характерное различие может иметь важное значение для кинетики связывания этих двух нейротоксинов с мишенью их действия — никотиновым ацетилхолиновым рецептором в постсинаптической мембране. Представляется весьма вероятным, что «длинные» и «короткие» нейротоксины обладают не только общим конформационным типом [117], но и сходной топографией связывания с рецептором [7, 79, 80, 82, 85–87, 119]. Однако конформационные перестройки «длинных» нейротоксинов, происходящие, по-видимому, с целью лучшего соответствия ориентации их функциональных групп структуре поверхности рецептора, могут обуславливать наблюдаемое понижение скоростей ассоциации и диссоциации «длинных» нейротоксинов [72] по сравнению с «короткими» токсинами, а также предоставлять комплексу нейротоксин — рецептор большую степень квазиобратимости, чем простое соответствие типа «ключ — замок». Конформационные перестройки «длинных» нейротоксинов при связывании также подтверждают тем, что скорость ассоциации  $\alpha$ -токсина *N. n. siamensis* с ацетилхолиновым рецептором быстро уменьшается с уменьшением температуры, тогда как скорость диссоциации практически не меняется [72, 120].

Исследование ЭПР-спектров спиновых меток, введенных по разным положениям молекул нейротоксинов змей, предоставило прямую информацию об областях нейротоксинов, вовлеченных в контакт с их мишенью — ацетилхолиновым рецептором постсинаптических мембран [7, 79, 80, 82, 85–87, 119]. Определение трехмерной структуры нейротоксинов привело к уточненной модели многоочечного связывания токсинов с никотиновым ацетилхолиновым рецептором, которая может помочь в создании новых нейромышечных блокирующих агентов. Молекулярное взаимодействие этих двух белков — результат многих вкладов, ни один из которых не является абсолютно необходимым. Размер многоочечной области связыва-

Смещение ЯМР-сигналов ( $\Delta\delta$ ) токсина 3 *N. n. siamensis* при протонировании имидазольного кольца гистидина-22

Аминокислотный остаток	Протон	$\delta$ , м. д. рН 7,5	$\Delta\delta$ , м. д. *
His <sup>22</sup>	C <sub>2</sub> H	7,71	0,77 **
Val <sup>23</sup>	$\gamma$ -CH <sub>3</sub>	0,76	-0,10 **
	$\gamma'$ -CH <sub>3</sub>	0,88	0,02
Pe <sup>1</sup>	$\gamma$ -CH <sub>3</sub>	0,73	-0,08 **
Tyr <sup>25</sup>	C <sub>2,6</sub> H	6,65	-0,05
	C <sub>3,5</sub> H	6,55	0,05
Phe <sup>4</sup>	C <sub>2,6</sub> H	6,87	-0,07
	C <sub>4</sub> H	7,10	0,03
Pe <sup>59</sup>	$\gamma$ -CH <sub>3</sub>	0,87	0,02
	$\delta$ -CH <sub>3</sub>	0,56	-0,03
Val <sup>41</sup>	$\gamma$ -CH <sub>3</sub>	0,57	0,02
	$\gamma'$ -CH <sub>3</sub>	0,51	-0,01
Val <sup>52</sup>	$\gamma$ -CH <sub>3</sub>	0,72	-0,02
	$\gamma'$ -CH <sub>3</sub>	0,81	-0,02
Phe <sup>71</sup>	C <sub>3,5</sub> H	7,33	0,02
Lys <sup>45</sup>	$\epsilon$ -CH <sub>2</sub>	2,94	0,02

\* Положительный знак отвечает смещению сигнала в сильное поле при повышении рН раствора.

\*\* Сигнал расщеплен при рК<sub>а</sub>5,6 гистидина-22.

ния может быть достаточно большим — 30×20 Å (например, расстояние между боковыми цепями лейцина-1 и гистидина-32 составляет 30 Å согласно рентгеноструктурному анализу эрабутоксина b [93, 121]). Действительно, полученные недавно результаты по фотоаффинному кросс-связыванию [87, 122—125] и электронной микроскопии [126] показали, что связанные с ацетилхолиновым рецептором молекулы нейротоксина находятся в прямом контакте сразу с несколькими субъединицами рецептора, а не только с  $\alpha$ -субъединицей, чья функция состоит в связывании природного нейротрансмиттера — ацетилхолина [73, 74]. Таким образом, найденная многоточечная топография области связывания нейротоксина, которая распространяется на несколько субъединиц ацетилхолинового рецептора, может служить целям фиксации четвертичной структуры с закрытым ионным каналом и тем самым препятствовать большим структурным изменениям, которые, по-видимому, необходимы для открытия канала и индуцирования проводимости нервного импульса [127].

### 5. Трехмерная структура двойных спиралей грамицидина А

Антибиотик [Val]грамицидин А, основной биологической функцией которого является ингибирование синтеза РНК [128—130], привлекает внимание своей способностью образовывать молекулярные каналы катионной проводимости в искусственных и биологических мембранах [131, 132]. Характерными особенностями химической структуры этого линейного олигопептида являются регулярное чередование *L*- и *D*-аминокислотных остатков (за исключением нехирального остатка глицина во втором положении вместо *D*-аминокислотного остатка), *N*-концевая формилированная аминогруппа и блокированная этанолампном *C*-концевая карбоксильная группа: HCO-*L*-Val-Gly-*L*-Ala-*D*-Leu-*L*-Ala-*D*-Val-*L*-Val-*D*-Val-*L*-Trp-*D*-Leu-*L*-Trp-*D*-Leu-*L*-Trp-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH.

Трансмембранный канал создается димерной формой грамицидина А [133]. В органических растворителях образуется равновесный набор конформационных состояний, зависящий от концентрации, температуры и состава среды [134, 135]. В неполярных средах, например в диоксане, на-

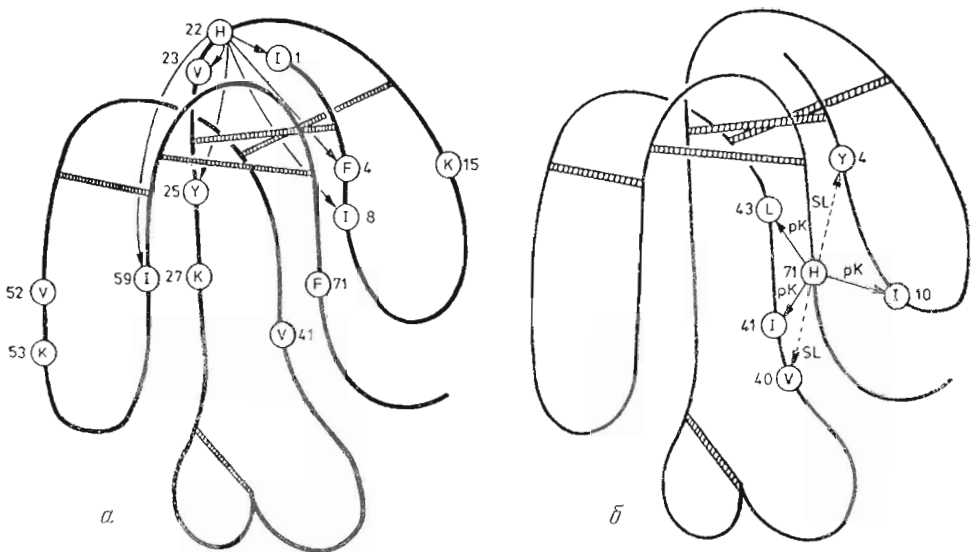


Рис. 29. Локализация и область наблюдения двух конформационных переходов «длинных» нейротоксинов змей. *a* — переход токсина 3 *N. n. siamensis*, пивцирированный протонированием гистидина-22 ( $pK_a$  5,6); стрелками указаны остатки, сигналы которых расщепляются при протонировании имидазольного кольца (табл. 7); *б* — переход в нейротоксине I *N. n. oxiana* с  $pK_a$  гистидина-71

блюдаются четыре медленно конвертирующие формы (так называемые формы 1–4) [134]. Принципы укладки основной цепи грамицидина А в этих структурах предложены на основании сравнения расчетных и экспериментальных ИК-спектров в сочетании с данными спектров КД [136]. Однако прямое определение конформации этих структур стало возможным лишь с применением 2D-спектроскопии  $^1\text{H}$ -ЯМР [137, 138].

[Val]Грамицидин А в форме 3 получен в виде гомогенного препарата путем очистки стандартного грамицидина D (Serva) методом противоточного распределения с последующей перекристаллизацией из этанола [134]. Доказательством гомогенности служит  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектр раствора этого препарата в диоксане, который содержит по одному сигналу от каждого химически неэквивалентного протона [137].

Отнесение сигналов от протонов грамицидина А проведено в два этапа (см. раздел 3). Анализ COSY-спектров позволили выделить большинство сигналов от протонов, связанных спин-спиновым взаимодействием (принадлежащих спиновой системе индивидуального остатка). Однако в ряде случаев COSY-спектры не позволяли провести однозначное отнесение сигналов. Так, например, химические сдвиги протонов  $\text{C}^\beta\text{H}$  трех остатков валина (6, 7 и 8) практически совпадают (рис. 30), поэтому не удается однозначно соотнести идентифицированные в COSY-спектрах спиновые системы протонов  $\text{NH} - \text{C}^\alpha\text{H} - \text{C}^\beta\text{H}$  с протонами  $\text{C}^1\text{H}_3$ -группы валиновых остатков. В этом и других подобных случаях использовали спектры RELSY [139], которые обеспечивают когерентную двухступенчатую передачу намагниченности в системе связанных скалярным спин-спиновым взаимодействием протонов. В спиновой системе протонов валинового остатка происходит когерентная передача намагниченности от протона  $\text{C}^\alpha\text{H}$  на протон  $\text{C}^\beta\text{H}$  и затем на протоны двух  $\text{C}^1\text{H}_3$ -групп. В RELSY-спектре (рис. 30) этот процесс обуславливает кросс-пики с координатами химических сдвигов протонов  $\text{C}^\alpha\text{H}$  и  $\text{C}^1\text{H}_3$ . Спиновые системы протонов  $\text{NH} - \text{C}^\alpha\text{H} - \text{C}^\beta\text{H}_2$  и протонов индольной группы остатков триптофана соотнесены с помощью ЯЭО между протонами  $\text{C}^\beta\text{H}_2$  и кольцевыми протонами  $\text{C}_2\text{H}$  и  $\text{C}_4\text{H}$ . Таким образом, в соответствии с аминокислотным составом [Val]-грамицидина А в 2D-спектрах COSY, RELSY и NOESY выделены спиновые системы двух остатков аланина, остатка глицина, четырех остатков

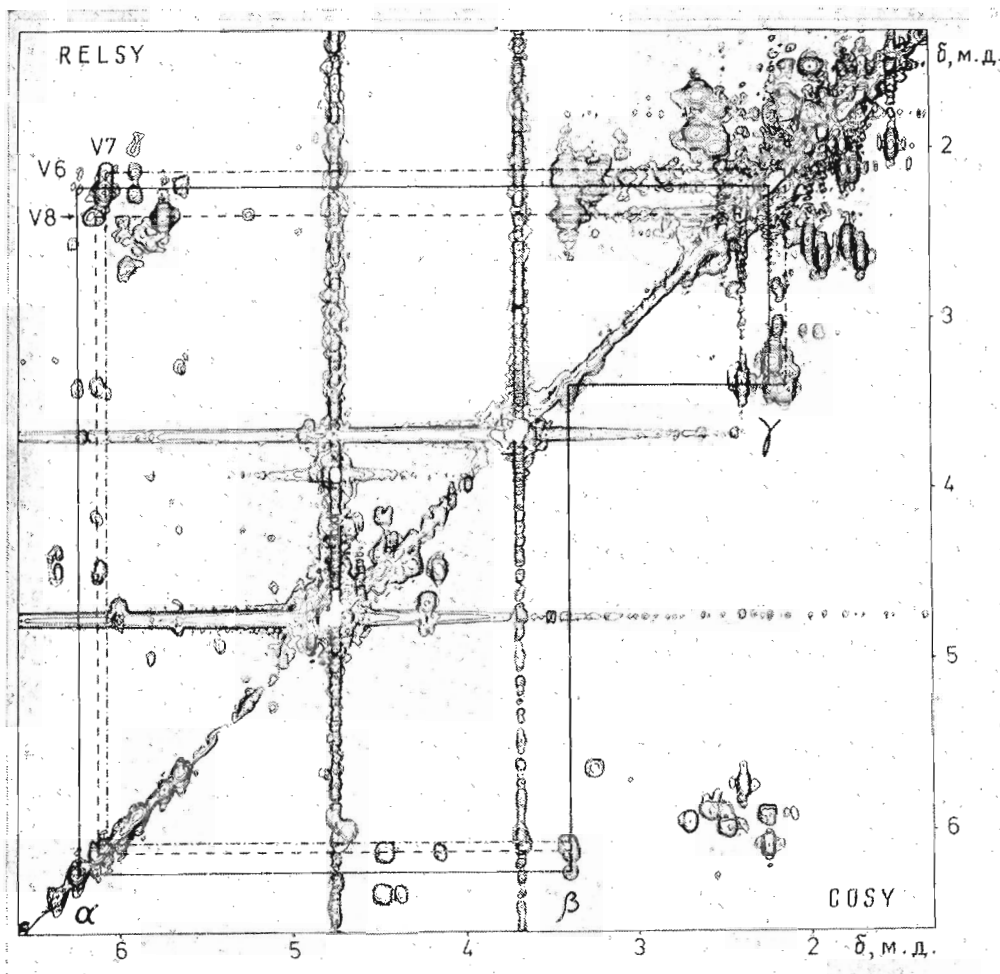


Рис. 30. Комбинированная диаграмма алифатических областей RELSY- и COSY-спектров  $\omega_1$  1,3–6,6 м.д.,  $\omega_2$  1,3–6,6 м.д. для 0,01 М раствора формы 3 [Val]грамицидина А в диоксане- $d_8$  (30° С). Протон-протонные  $J$ -связи показаны для спиновых систем  $C^\alpha H - C^\beta H (C^1 H_3)$  остатков  $D\text{-Val}^6$  (сплошная линия),  $\text{Val}^7$  (штрихпунктирная линия) и  $D\text{-Val}^8$  (штриховая линия). Химические сдвиги отнесены к внутреннему стандарту – тетраметилсилану

валина, четырех остатков лейцина, четырех остатков триптофана и С-концевого остатка этаноламина [137, 138].

На втором этапе отнесения сигналов от протонов аминокислотных остатков к определенному положению в аминокислотной последовательности использованы  $d_1$ -,  $d_2$ - и  $d_3$ -взаимодействия ЯЭО между протоном NH данного остатка и соответственно протонами  $C^\alpha H$ , NH и  $C^\beta H$  предыдущего по аминокислотной последовательности остатка (рис. 15). Эти  $d$ -связи проявляются в виде соответствующих кросс-пиков в NOESY-спектре. В условиях, исключающих спиновую диффузию ( $\tau_m = 120$  мс), все остатки от этаноламина до  $\text{Val}^1$  обнаруживают в NOESY-спектре  $d_1$ -связь,  $d_2$ -связи отсутствуют, а  $d_3$ -связи наблюдаются в четырех случаях [137].

Рассмотрим в качестве примера отнесение аминокислотных остатков [Val]грамицидина А через  $d_1$ -связи. В представленной на рис. 31 COSY – NOESY-диаграмме область кросс-пиков  $H - NC^\alpha - H$  в COSY-спектре скомбинирована с соответствующей областью в NOESY-спектре. Эта диаграмма содержит в NOESY-спектре кросс-пики ЯЭО, соответствующие  $d_1$ -связям между протоном  $N_{i+1}H$  и протоном  $C_i^\alpha H$  предыдущего по аминокислотной последовательности  $i$ -го остатка, а в COSY-спектре – кросс-пики, отвечающие  $J$ -связям между протонами NH и  $C^\alpha H$  одного и того же остатка. Если следовать по полипептидной цепи в направлении от С- к N-концу,

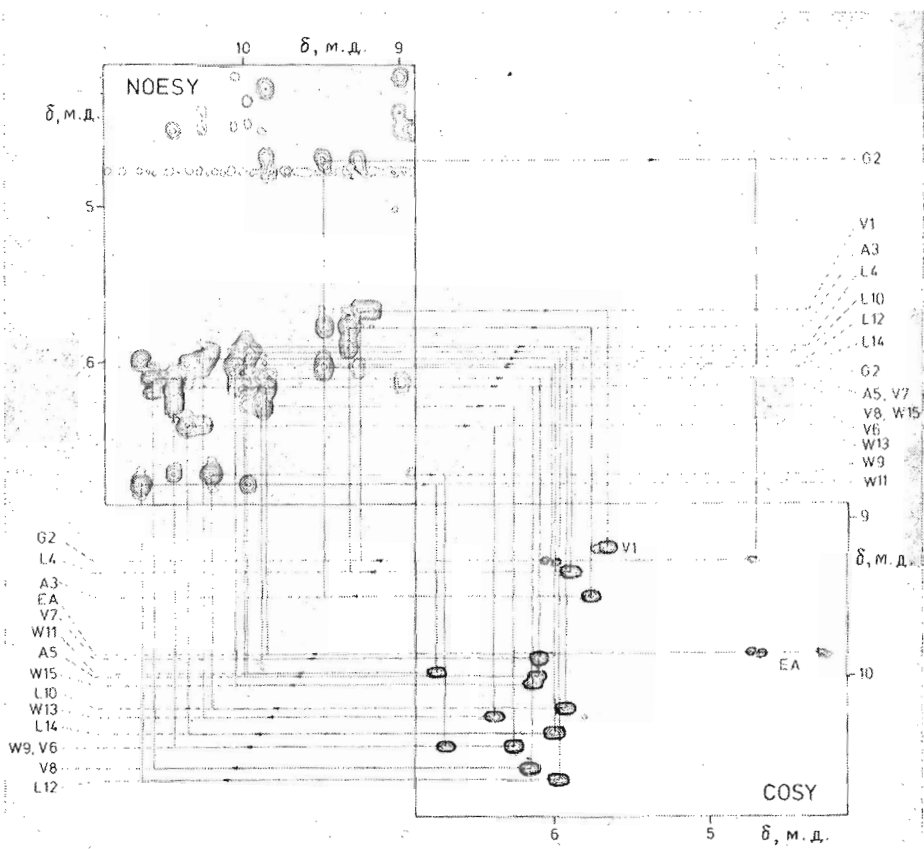


Рис. 31. Комбинированная COSY – NOESY-диаграмма для отнесения сигналов формы 3 грамицидина А в диоксане- $d_8$  при помощи ЯЭО между амидным протоном NH данного остатка и протоном  $C^{\alpha}H$  предыдущего по аминокислотной последовательности остатка ( $d_1$ -связь). Вверху слева расположена область  $\omega_1$  4,1–6,9 м.д. и  $\omega_2$  8,9–10,9 м.д. NOESY-спектра, внизу справа – область  $\omega_1$  8,9–10,9 м.д. и  $\omega_2$  4,1–6,9 м.д. COSY-спектра, полученного при идентичных экспериментальных условиях методом совмещенного COSY – NOESY-эксперимента [66]. Прямые линии со стрелками обозначают  $d_1$ -связи между соседними остатками в аминокислотной последовательности. Отнесение химических сдвигов амидных протонов к аминокислотным остаткам [Val]грамицидина А указано внизу слева, а протонов  $C^{\alpha}H$  – вверху справа

соединяя линиями соответствующие  $J$ - и ЯЭО-кросс-пики, то они образуют спиральную ломаную линию, направленную по часовой стрелке.

Заключительным этапом конформационного ЯМР-анализа является построение пространственной структуры молекулы. На основе отнесения химических сдвигов протонов проведен анализ NOESY-спектра [Val]грамицидина А, полученного в условиях, исключающих спиновую диффузию. Этот анализ обнаружил свыше 50 взаимодействий ЯЭО между протонами удаленных по аминокислотной последовательности остатков [136, 137]. Кроме того, при конструировании пространственной структуры грамицидина А приняты во внимание данные о локальном состоянии аминокислотных остатков. Так, например,  $d_1$ -,  $d_2$ - и  $d_3$ -связи содержат информацию о торсионных углах  $\varphi$ ,  $\psi$  и  $\chi^1$  [63, 68], константы спин-спинового взаимодействия вицинальных протонов и  $H-NC^{\alpha}-H$  – о торсионных углах  $\varphi$  [5], времена полуобмена водородов групп NH на дейтерий – об участии NH в водородных связях.

Пространственная структура полипептида является сложной функцией большого числа параметров. Поэтому полный конформационный ЯМР-анализ может быть выполнен в общем случае только с помощью ЭВМ, позволяющей манипулировать большими массивами данных (см. раздел 4.2). Однако высокая степень симметрии пространственной структуры формы 3

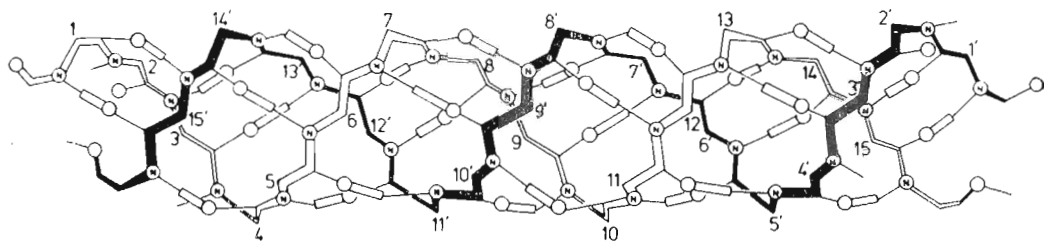


Рис. 32. Схематическое изображение конформации левой антипараллельной двойной спирали  $\uparrow\downarrow\text{лл}_{LD}^{5,6}$  формы 3 [Val]грамидина А в диоксане. Боковые цепи аминокислотных остатков не показаны, чтобы не перегружать рисунок. Межмолекулярные водородные связи обозначены прямоугольниками

грамидина А дает возможность охарактеризовать конформацию основной цепи молекулы, не прибегая к помощи ЭВМ.

Наличие  $d_1$ -связей и отсутствие  $d_2$ -связей между соседними по аминокислотной последовательности остатками, а также высокие значения констант взаимодействия вицинальных протонов  $\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H}$  (7–9 Гц) указывают [6, 68] на вытянутую структуру основной цепи грамицидина А. Данные осмометрического определения молекулярной массы показали [140], что грамицидин А в форме 3 является димером. Основная часть амидных водородов NH медленно обменивается на дейтерий, что свидетельствует об их участии в водородных связях ( $t_{1/2} > 12$  ч, для 4%  $\text{C}^2\text{H}_3\text{O}^2\text{H}$  в диоксане- $d_8$  при 30°С). Только водороды NH остатков Val<sup>1</sup>, Gly<sup>2</sup> и, вероятно, D-Leu<sup>4</sup> обмениваются на дейтерий быстрее ( $t_{1/2} \sim 1$  ч). Добавление воды или спирта к раствору грамицидина А в форме 3 в диоксане приводит к слаболольному сдвигу сигналов (на 0,06–0,15 м.д.) от амидных протонов остатков Val<sup>1</sup>, Gly<sup>2</sup>, Ala<sup>3</sup> и D-Leu<sup>4</sup>, что указывает на доступность для контакта с молекулами среды либо этих амидных групп NH, либо карбонильных групп соответствующих пептидных связей.

Для того чтобы пространственная структура димера грамицидина А в форме 3 удовлетворяла данным спектроскопии ЯМР, две вытянутые полипептидные цепи должны образовывать антипараллельную  $\beta$ -структуру. При этом, однако, между протонами двух основных цепей реализуется только часть водородных связей и наблюдаемых в NOESY-спектре контактов. Для образования остальных водородных связей и пространственных контактов необходимо свернуть антипараллельную  $\beta$ -структуру в левую двойную спираль с 5,6 остатка на виток, как показано на рис. 32.

Таким образом, анализ всей совокупности данных ЯМР-спектроскопии приводит к однозначному выводу, что форма 3 грамицидина А в диоксане представляет собой левую антипараллельную двойную спираль типа  $\uparrow\downarrow\text{лл}_{LD}^{5,6}$  [137, 138]. Эта димерная структура имеет ось симметрии  $C_2$ , перпендикулярную оси спирали. Длина двойной спирали, измеренная между атомами кислорода формильных групп, равна 36 Å. В найденной конформации имеется 28 межмолекулярных водородных связей. Карбонильные группы N-концевой формильной группы и остатка Gly<sup>2</sup>, а также амидные NH-группы остатков Gly<sup>2</sup> и D-Leu<sup>4</sup> не принимают участия в водородных связях. Соответственно амидные водороды остатков Gly<sup>2</sup> и Leu<sup>4</sup> быстро обмениваются на дейтерий. Быстрый обмен амидного протона остатка Val<sup>1</sup> объясняется его расположением на краю двойной спирали и, следовательно, высокой доступностью для молекул растворителя. В табл. 8 указаны протоны двух основных цепей димера формы 3 грамицидина А, сближенные до расстояния менее 3,5 Å (по нашим оценкам, при расстоянии  $\sim 3,5$  Å между протонами в NOESY-спектре с временем  $\tau_m = 120$  мс должен наблюдаться соответствующий кросс-пик). Как следует из табл. 8, не только наличие или отсутствие соответствующего кросс-пика ЯЭО, но и интенсивность кросс-пиков хорошо согласуются с расстояниями между протонами, измеренными на молекулярной модели (интенсивность кросс-пиков ЯЭО в NOESY-спектре зависит от многих факторов, но при услови-



Контакты между протонами двух основных цепей димерной формы 3 грамицидина А в диоксане и наблюдаемые кросс-пики ЯЭО между соответствующими протонами в NOESY-спектре ( $\tau_m = 120$  мс)

NH—NH'		C $^{\alpha}$ H—C $^{\alpha}$ H'		NH—C $^{\alpha}$ H'		C $^{\alpha}$ H—NH'	
молекулярная модель	наблюдение	молекулярная модель	наблюдение	молекулярная модель	наблюдение	молекулярная модель	наблюдение
V1—W15'	М	V1—нет	Нет	V1—нет	Нет	V1—нет	Нет
G2—нет	Нет	G2—L14'	а	G2—нет	Нет	G2—W15'	б
A3—W13'	М	A3—нет	Нет	A3—L14'	б	A3—нет	Нет
L4—EA'	М	L4—L12'	а	L4—нет	Нет	L4—W13'	М
A5—W11'	а	A5—W15'	а	A5—L12'	М	A5—EA'	б
V6—L14'	а	V6—L10'	Б	V6—W15'	М	V6—W11'	М
V7—W9'	М	V7—W13'	Б	V7—L10'	М	V7—L14'	М
V8—L12'	а	V8—V8'	а	V8—W13'	М	V8—W9'	б
W9—V7'	М	W9—W11'	а	W9—V8'	б	W9—L12'	М
L10—L10'	а	L10—V6'	Б	L10—W11'	М	L10—V7'	М
W11—A5'	а	W11—W9'	а	W11—V6'	М	W11—L10'	М
L12—V8'	а	L12—L4'	а	L12—W9'	М	L12—A5'	М
W13—A3'	М	W13—V7'	Б	W13—L4'	М	W13—V8'	М
L14—V6'	а	L14—G2'	а	L14—V7'	М	L14—A3'	б
W15—V1'	М	W15—A5'	а	W15—G2'	б	W15—V6'	М
EA—L4'	М	EA—нет	Нет	EA—A5'	б	EA—Formyl	М
				Formyl—EA	М		

Примечание. Расстояния, измеренные на модели Драйдингга  $\uparrow\downarrow\pi_{LD}^{5,6}$  двойной спирали грамицидина А между протонами NH—NH', C $^{\alpha}$ H—C $^{\alpha}$ H' и NH—C $^{\alpha}$ H', равны соответственно 3,4; 2,4 и 3,4 Å. Буквами М и Б обозначена интенсивность кросс-пики ЯЭО: соответственно малоинтенсивный и интенсивный; а — кросс-пик ЯЭО не обнаружен в NOESY-спектре, поскольку он близок к интенсивному диагональному пику, б — кросс-пик ЯЭО перекрывается с другим кросс-пином.

ях, исключаящих спиновую диффузию, она обратно пропорциональна шестой степени межатомного расстояния [141]). Константы спин-спинового взаимодействия протонов H—NC $^{\alpha}$ —H также хорошо согласуются со значениями торсионных углов  $\varphi_L$  от  $-140$  до  $-160^\circ$  для L-аминокислотных остатков и  $\varphi_D$   $150-160^\circ$  для D-аминокислотных остатков. Теоретический конформационный анализ [142] дал углы  $\varphi_L -121^\circ$  и  $\varphi_D 144^\circ$  для идеальной левой антипараллельной двойной спирали типа  $\uparrow\downarrow\pi_{LD}^{5,6}$ , состоящей из аланиновых остатков.

Полученный результат подтверждает предложенную на основании анализа ИК-спектров [136] структуру для формы 3 грамицидина А в диоксане типа левой спирали  $\uparrow\downarrow\pi_{LD}^{5,6}$  и уточняет положение водородных связей в димере. Подтверждается также интерпретация ИК-полосы Амид I  $1633\text{ см}^{-1}$  как характеристичной для двойной спирали указанного типа. Вместе с тем ЯМР-спектры не обнаружили для формы 3 признаков минорных односторонних димеров  $\pi_{LD}\pi_{LD}$ , предполагавшихся по данным ИК-спектроскопии [136]. Указанное расхождение может быть связано с тем обстоятельством, что ИК-спектры димеров  $\uparrow\downarrow\pi_{LD}^{5,6}$  были рассчитаны для теоретически построенной идеальной спирали, торсионные углы  $\varphi$  для которой могут отличаться от наблюдаемых в растворе.

Такие структурные характеристики димерной формы 3, как диаметр аксиальной полости  $\sim 3\text{ Å}$ , гидрофобная внешняя поверхность и длина  $\sim 36\text{ Å}$ , удовлетворяют требованиям, предъявляемым к пространственной структуре трансмембранного канала. В настоящее время для интерпретации данных по мембранной активности грамицидина А в литературе обсуждаются две димерные модели трансмембранного канала его молекулы. Первая из них, предложенная в работах [143, 144], представляет собой ассоциацию двух спиралей типа  $\pi_{LD}^{6,3}$  с шестью межмолекулярными водородными связями по принципу N-конец к N-концу ( $\pi_{LD}^{6,3}\pi_{LD}^{6,3}$ ). Вторая модель [134] является антипараллельной двойной спиралью с 5,6 или 7,2 остатками на виток, стабилизированной 28 межмолекулярными водородными связями ( $\uparrow\downarrow\pi_{LD}^{5,6}$  или  $\uparrow\downarrow\pi_{LD}^{7,2}$ ).

Функционирование грамицидиновых каналов на бислоиных мембранах происходит при очень низких концентрациях антибиотика ( $\sim 10^5$  молекул липида на одну молекулу грамицидина А) [145]. Поскольку спектры КД и ИК грамицидина А, встроенного в липосомы различных фосфолипидов, зависят от соотношения пептид/липид [146, 147], наибольший интерес представляют данные о пространственной структуре, полученные при возможно низкой концентрации антибиотика в липосомах. По данным ИК-спектроскопии для грамицидина А и его аналогов, встроенных в липосомы дипальмитоилфосфатидилхолина при отношении пептид/липид  $\approx 1/300$ , частота полосы Амид I  $1634 \text{ см}^{-1}$  совпадает с частотой, наблюдаемой для раствора грамицидина А в диоксане и отвечающей спирали типа  $\uparrow\downarrow\pi\pi_{LD}^{5,6}$  [136, 145]. При повышении отношения грамицидин/липид от  $1/300$  до  $\approx 1/75$  в спектре КД появляется положительная полоса при 219 нм, не наблюдавшаяся для димерных спиральных форм [134] и характерная для DL-изгиба [149], а максимум полосы Амид I смещается от  $1634$  к  $1628-1631 \text{ см}^{-1}$  (в зависимости от фосфолипида) [131, 146, 147], что указывает на образование ассоциатов большего порядка, чем димер. Наиболее вероятной структурой этих ассоциатов является антипараллельный  $\beta$ -слой [146, 149].

Вместе с тем Юри и сотр. [150–153], исходя из данных  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии и предполагая, что основная структурная единица в исследуемой системе — димер (не исключая возможную ассоциацию димеров с сохранением их конформации [154]), пришли к выводу, что единственная структура антибиотика в липосомах лизолецитина при отношении пептид/липид  $\approx 1/30$  — димер типа  $\overleftrightarrow{\pi}_{LD}^{6,3}\overleftrightarrow{\pi}_{LD}^{6,3}$ . Несовпадение между частотой полосы Амид I ( $1633 \pm 1 \text{ см}^{-1}$ ) грамицидина А в липосомах лизолецитина с теоретически рассчитанной частотой полосы Амид I ( $1656 \text{ см}^{-1}$ ) для димеров типа  $\overleftrightarrow{\pi}_{LD}^{6,3}\overleftrightarrow{\pi}_{LD}^{6,3}$  [136] Юри и сотр. [152] объясняют несовершенством метода расчета. В связи с этим необходимо отметить, что корректность метода теоретического расчета ИК-спектров полипептидов [136] подтверждается тем, что структурный тип  $\uparrow\downarrow\pi\pi_{LD}^{5,6}$  для формы 3 в диоксане, предсказанный путем сопоставления экспериментальных и теоретических ИК-спектров для различных типов структур, совпал с найденным методом ЯМР-спектроскопии. Отнесение частоты полосы Амид I ИК-спектра к димерам типа  $\overleftrightarrow{\pi}_{LD}^{6,3}\overleftrightarrow{\pi}_{LD}^{6,3}$  подтверждено результатами исследования бис-аналогов грамицидина А [131, 146, 147, 149].

Таким образом, данные  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии [150–153], свидетельствующие о присоединении катионов металлов в области остатков 9–13 встроенного в липосомы грамицидина А, нельзя рассматривать ни как прямое доказательство структуры типа  $\overleftrightarrow{\pi}_{LD}^{6,3}\overleftrightarrow{\pi}_{LD}^{6,3}$ , ни как отрицание структур типа  $\uparrow\downarrow\pi\pi_{LD}^{5,6}$ . Напротив, анализ ИК-спектров димерной формы 3 в диоксане и грамицидина А, встроенного в липосомы при низком отношении пептид/липид ( $\sim 1/300$ ), не обнаруживает различий между этими структурами [146, 149]. Результаты ЯМР-анализа [137, 138] свидетельствуют о том, что димерную форму грамицидина А, представляющую собой антипараллельную двойную спираль типа  $\uparrow\downarrow\pi\pi_{LD}^{5,6}$ , следует принимать во внимание как одну из возможных моделей трансмембранного канала.

При связывании грамицидина А с катионами металлов структура спирали может изменяться. Так, 2D-ЯМР-спектроскопией показано, что в комплексе с ионами  $\text{Cs}^+$  образуется правая антипараллельная спираль типа  $\uparrow\downarrow\pi\pi_{LD}^{7,2}$ .

Выделение остальных форм 1, 2 и 3 природного грамицидина А в индивидуальном состоянии сопряжено с существенными экспериментальными трудностями [134]. Однако известны синтетические аналоги грамицидина А, принимающие стабильные структуры с иной, чем в форме 3, конформацией [136]. Один из таких аналогов *des-L-Ala*<sup>3</sup>, *D-Leu*<sup>4</sup>, *L-Ala*<sup>5</sup>, *D-Val*<sup>6</sup>-грамицидин А ( $\text{HCO-Val-Gly-Val-D-Val-Trp-D-Leu-Trp-D-Leu-Trp-D-Leu-Trp-NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ) исследован в растворе диоксана методами 2D-спектроскопии ЯМР. На основе спектральных параметров (ЯЭО, константы спин-спинового взаимодействия, скорость дейтерообмена) построена про-

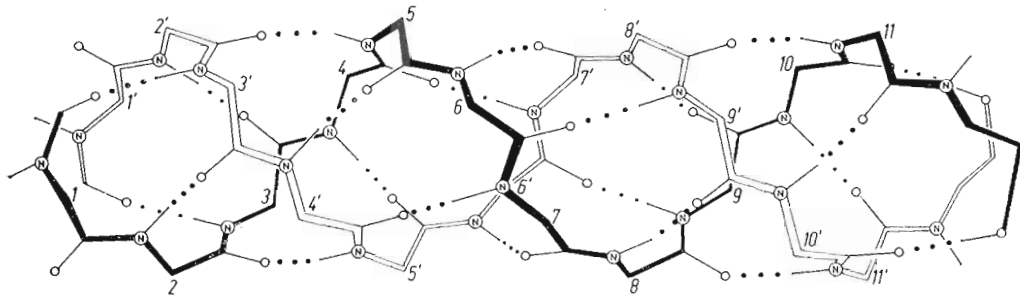


Рис. 33. Пространственное строение основных цепей des-*L*-Ala<sup>3</sup>, *D*-Leu<sup>4</sup>, *L*-Ala<sup>5</sup>, *D*-Val<sup>6</sup>-граммицидина А в конформации правой параллельной двойной спирали типа  $\uparrow\downarrow\pi L_{LD}^{5,6}$ . Межмолекулярные водородные связи отмечены тремя точками

структурная структура этого аналога, представляющая собой параллельную правую двойную спираль типа  $\uparrow\downarrow\pi L_{LD}^{5,6}$  (рис. 33). Таким образом, данный тип спиральной структуры грамицидина А, гипотетически предложенными остатками, получил экспериментальное подтверждение.

В работе [134] для полипептидов с чередующимися *L*- и *D*-аминокис-

Структурные параметры параллельной  $\uparrow\downarrow\pi L_{LD}^{5,6}$ -спирали (диаметр аксиальной полости, гидрофобная внешняя поверхность и длина), так же как параметры рассмотренной выше антипараллельной спирали  $\uparrow\downarrow\pi L_{LD}^{5,6}$  [Val]грамицидина А, удовлетворяют требованиям, предъявляемым к строению трансмембранного канала. Следовательно, оба указанных типа спиралей должны быть приняты во внимание как возможные модели канала.

## 6. Заключение

Применение ЯМР-спектроскопии для изучения белково-пептидных веществ насчитывает немногим более 25 лет. За это время пройден путь от простой регистрации спектров до анализа полного пространственного строения молекул в растворах. Решающую роль на этом пути сыграли, во-первых, разработка специальных методов интерпретации спектров и установление связи спектральных параметров с конформацией белково-пептидных веществ и, во-вторых, развитие физической теории и совершенствование аппаратного оснащения ЯМР-спектроскопии, в частности создание магнитов с высокой напряженностью поля и внедрение электронно-вычислительной техники.

Конечно, есть еще целый ряд ограничений и трудностей в применении ЯМР-спектроскопии в данной области физико-химической биологии. Например, на современном этапе еще трудно получить полный объем информации о пространственном строении белковых молекул с массой более 10 кДа, трудно также исследовать мембранные белки в их естественном окружении. Однако опыт предыдущих лет и особенно нарастающие темпы прогресса ЯМР-спектроскопии в последние годы вселяют непрекращаемую уверенность в то, что впереди нас ждет открытие многих новых возможностей и областей применения этого одного из мощнейших методов физико-химической биологии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. International Union of biochemistry, biochemical nomenclature and related documents. London: The Biochemical Society, 1978.
2. Jardetzky O., Roberts G. C. K. NMR in molecular biology. N. Y.: Acad. Press, 1981.
3. Bax A. Two-dimensional nuclear magnetic resonance in liquids. Dordrecht: D. Reidel Publ. Co, 1982.
4. Nagayama K. Adv. Biophys., 1981, v. 14, № 1, p. 139–204.
5. Bystrov V. F. Progr. NMR Spectr., 1976, v. 10, part 2, p. 41–81.
6. Bystrov V. F., Arseniev A. S., Gavrilov Yu. D. J. Magn. Res., 1978, v. 30, № 2, p. 151–184.
7. Bystrov V. F., Ivanov V. T., Okhanov V. V., Miroshnikov A. I., Arseniev A. S., Tsetlin V. I., Pashkov V. S., Karlsson E. In: Advances in solution chemistry/Eds Bertini I., Lunazzi L., Dei A. N. Y.—L.: Plenum Press, 1981, p. 231–251.

8. *Ovchinnikov Yu. A., Ivanov V. T. Tetrahedron*, 1975, v. 31, № 18, p. 2177-2209.
9. *Bystrov V. F., Portnova S. L., Tsetlin V. I., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. Tetrahedron*, 1969, v. 25, № 3, p. 493-515; *Ж. общ. химии*, 1971, т. 41, № 2, с. 407-419.
10. *Bystrov V. F., Portnova S. L., Balashova T. A., Tsetlin V. I., Ivanov V. T., Kostetskii P. V., Ovchinnikov Yu. A. Tetrahedron Lett.*, 1969, № 59, p. 5225-5228; *Ж. общ. химии*, 1971, т. 41, № 2, с. 407-419.
11. *Karplus M. J. Chem. Phys.*, 1959, v. 30, № 1, p. 11-14.
12. *Karplus M. J. Amer. Chem. Soc.*, 1963, v. 85, № 18, p. 2870-2874.
13. *Bystrov V. F., Portnova S. L., Balashova T. A., Koz'min S. A., Gavrilo Yu. D., Afanasiev V. A. Pure Appl. Chem.*, 1973, v. 36, № 1, p. 19-34.
14. *Bystrov V. F., Ivanov V. T., Portnova S. L., Balashova T. A., Ovchinnikov Yu. A. Tetrahedron*, 1973, v. 29, № 6, p. 873-877.
15. *Солкан В. Н., Быстров В. Ф. Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 1974, № 6, с. 1308-1313.
16. *Solkan V. N., Bystrov V. F. Tetrahedron Lett.*, 1973, № 25, p. 2261-2264.
17. *Delepierre M., Dobson C. M., Poulsen E. M. Biochemistry*, 1982, v. 21, № 19, p. 4756-4761.
18. *Bystrov V. F., Gavrilo Yu. D., Solkan V. N. J. Magn. Res.*, 1975, v. 19, № 1, p. 123-129.
19. *Bystrov V. F., Gavrilo Yu. D., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. Eur. J. Biochem.*, 1977, v. 78, № 1, p. 63-82.
20. *Иванов В. Т., Лайне И. А., Абдулаев Н. Д., Плетнев В. З., Липкинд Г. М., Архипова С. Ф., Сенявина Л. Б., Мещерякова Е. Н., Попов Е. М., Быстров В. Ф., Овчинников Ю. А. Химия природн. соед.*, 1971, № 3, с. 221-246.
21. *Chandrasekaran R., Lakshminarayanan A. V., Pandya U. V., Ramachandran G. N. Biochim. et biophys. acta*, 1973, v. 303, № 1, p. 14-27.
22. *Smith G. D., Duax W. L., Lungs D. A., DeTitta G. T., Edmonds J. N., Rohrer D. C., Weeks C. M. J. Amer. Chem. Soc.*, 1975, v. 97, № 25, p. 7242-7247.
23. *Asher I. M., Rothschild K. J., Anastassakis E., Eugene H. J. Amer. Chem. Soc.*, 1977, v. 99, № 7, p. 2024-2032.
24. *Плетнев В. З., Галацкий Н. М., Иванов В. Т., Овчинников Ю. А. Биооргани. химия*, 1977, т. 3, № 10, с. 1427-1429.
25. *Bystrov V. F., Ivanov V. T., Koz'min S. A., Mikhaleva I. I., Khalilulina K. Kh., Ovchinnikov Yu. A., Fedin E. I., Petrovskii P. V. FEBS Lett.*, 1972, v. 21, № 1, p. 34-38.
26. *Neupert-Laves K., Dobler M. Helv. chim. acta*, 1975, v. 58, № 2, p. 432-442.
27. *Солкан В. Н., Быстров В. Ф. Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 1974, № 1, с. 102-109.
28. *Быстров В. Ф., Оганов В. В., Арсеньев А. С., Афанасьев В. А., Гуревич А. З. Биооргани. химия*, 1980, т. 6, № 3, с. 386-392.
29. *Billeter M., Braun W., Wüthrich K. J. Mol. Biol.*, 1982, v. 155, № 3, p. 321-346.
30. *Okhanov V. V., Afanasiev V. A., Bystrov V. F. J. Magn. Res.*, 1980, v. 40, № 1, p. 191-195.
31. *Freeman R., Anderson W. A. J. Chem. Phys.*, 1962, v. 37, № 5, p. 2053-2073.
32. *Bystrov V. F. Bull. Magn. Res.*, 1983, v. 5, № 3/4, p. 152-156.
33. *Habermann E. Science*, 1972, v. 177, № 4046, p. 314-322.
34. *Habermann E., Fisher K. In: Advances in cytopharmacology/Eds Saccarelli B., Clementi F. N. Y.: Raven Press, 1979, v. 3, p. 387-394.*
35. *Байдан Л. В., Владимирова И. А., Мирошников А. И., Таран Г. А. Докл. АН СССР*, 1978, т. 241, № 5, с. 1224-1227.
36. *Елякова Е. Г., Луценко В. К., Подрезова Е. И., Луценко Н. Г., Мирошников А. И. Биооргани. химия*, 1981, т. 7, № 11, с. 1651-1659.
37. *Hugues M., Romey G., Duval D., Vincent J. P., Lazdunski M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1982, v. 79, № 4, p. 1308-1312.
38. *Мирошников А. И., Елякова Е. Г., Куделин А. Б., Сенявина Л. Б. Биооргани. химия*, 1978, т. 4, № 8, с. 1022-1028.
39. *Bystrov V. F., Arseniev A. S., Kondakov V. I., Maiorov V. N., Okhanov V. V., Ovchinnikov Yu. A. In: Toxins as tools in neurochemistry/Eds Hucho F., Ovchinnikov Yu. A. Berlin (West): W. de Gruyter, 1983, p. 293-309.*
40. *Оганов В. В., Афанасьев В. А., Гуревич А. З., Елякова Е. Г., Мирошников А. И., Быстров В. Ф., Овчинников Ю. А. Биооргани. химия*, 1980, т. 6, № 6, с. 840-864.
41. *Bystrov V. F., Okhanov V. V., Miroshnikov A. I., Ovchinnikov Yu. A. FEBS Lett.*, 1980, v. 119, № 1, p. 113-117.
42. *Wemmer D., Kallenbach N. R. Biochemistry*, 1983, v. 22, № 8, p. 1901-1906.
43. *Wyssbrod P. R., Gibbons W. A. Surv. Progr. Chem.*, 1973, v. 6, p. 209-325.
44. *Нурхаматов А. Х., Елякова Е. Г., Ефремов Е. С., Мирошников А. И. Биооргани. химия*, 1981, т. 7, № 1, с. 16-24.
45. *Hider R. C., Ragnarsson U. FEBS Lett.*, 1980, v. 111, № 1, p. 189-193.
46. *Chou P. Y., Fasman G. D. Adv. Enzymol.*, 1978, v. 47, p. 45-148.
47. *Van Wart H. E., Scheraga H. A. J. Phys. Chem.*, 1976, v. 80, № 16, p. 1823-1832.
48. *Попов Е. М., Мельников П. Н. Биооргани. химия*, 1979, т. 5, № 6, с. 828-847; № 7, с. 1011-1024; № 10, с. 1471-1494; 1980, т. 6, № 1, с. 21-30.
49. *Busetta B. FEBS Lett.*, 1980, v. 112, № 2, p. 138-142.
50. *Hider R. C., Ragnarsson U. Biochim. et biophys. acta*, 1981, v. 667, № 1, p. 197-208.
51. *Van Rietschoten J., Granier C., Rochat P., Lissitzky S., Miranda F. Eur. J. Biochem.*, 1975, v. 56, № 1, p. 35-40.
52. *Cosand W. L., Merrifield R. B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, v. 74, № 7, p. 2771-2775.

53. Sandberg B. E. B., Ragnarsson U. *Int. J. Peptide and Protein Res.*, 1975, v. 7, № 6, p. 503–504; 1978, v. 11, № 3, p. 238–245.
54. Нуриддинов А. Р., Жукова Г. Ф., Цетлин В. И., Иванов В. Т. *Биоорган. химия*, 1978, т. 4, № 10, с. 1322–1333.
55. Sandberg B. E. B. *Int. J. Peptide and Protein Res.*, 1979, v. 13, № 3, p. 327–333.
56. Нуриддинов А. Р., Оханов В. В., Цетлин В. И., Иванов В. Т. *Биоорган. химия*, 1981, т. 7, № 1, с. 5–15.
57. Vincent J. P., Schweitz H., Lazdunski M. *Biochemistry*, 1975, v. 14, № 11, p. 2521–2525.
58. Granier C., Podroso Muller E., van Rietschoten J. *Eur. J. Biochem.*, 1978, v. 82, № 1, p. 293–299.
59. Granier G., van Rietschoten J. In: *Natural toxins*/Eds Eaker D., Wadström T. Oxford: Pergamon Press, 1980, p. 481–490.
60. Grishin E. V. In: *Frontiers of bioorganic chemistry and molecular biology*/Ed. Ananchenko S. N. Oxford – New York: Pergamon Press, 1980, p. 93–96.
61. Гришин Е. В., Волкова Т. М., Солдатова Л. Н. *Биоорган. химия*, 1982, т. 8, № 2, с. 155–164.
62. Арсеньев А. С., Кондаков В. И., Майоров В. Н., Волкова Т. М., Гришин Е. В., Быстров В. Ф., Овчинников Ю. А. *Биоорган. химия*, 1983, т. 9, № 6, с. 768–793.
63. Rochat H., Bernard P., Courand F. In: *Advances in cytopharmacology*/Eds Sessarelli B., Clementi F. N. Y.: Raven Press, 1979, v. 3, p. 325–334.
64. Arseniev A. S., Kondakov V. I., Maiorow V. N., Bystrov V. F. *FEBS Lett.*, 1984, v. 165, № 1, p. 57–62.
65. Арсеньев А. С., Кондаков В. И., Майоров В. Н., Быстров В. Ф., Овчинников Ю. А. *Биоорган. химия*, 1983, т. 9, № 12, с. 1667–1690.
66. Gurevich A. Z., Barsukov I. L., Arseniev A. S., Bystrov V. F. *J. Magn. Res.*, 1984, v. 56, № 3, p. 471–478.
67. Motany F. A., McGuire R. F., Burgess A. W., Sheraga H. A. *J. Phys. Chem.*, 1975, v. 79, № 22, p. 2361–2381.
68. Billeter M., Braun W., Wüthrich K. *J. Mol. Biol.*, 1982, v. 155, № 3, p. 321–346.
69. Mandel N., Mandel G., Trus B. L., Rosenberg J., Carlson G., Dickerson R. E. *J. Biol. Chem.*, 1977, v. 252, № 13, p. 4619–4636.
70. Crippen G. M. *Distance geometry and conformational calculations*. Chichester: Research Studies Press, 1981.
71. Fontecilla-Camps J. C., Almasy R. J., Ealick S. E., Suddath F. L., Watt D. D., Feldmann R. J., Bugg C. E. *Trends in Biochem. Sci.*, 1981, v. 6, № 11, p. 291–296.
72. Karlsson E. In: *Snake venoms (Handbook of experimental pharmacology)*/Ed. Lee C.-Y. Berlin – Heidelberg – New York: Springer Verlag, 1978, v. 52, p. 159–212.
73. Hucho F. *Trends in Biochem. Sci.*, 1981, v. 6, № 9, p. 242–245.
74. Conti-Tronconi B. M., Raftery M. A. *Ann. Rev. Biochem.*, 1982, v. 51, p. 491–530.
75. Tsetlin V. I., Mikhaleva I. I., Myagkova M. A., Senyavina L. B., Arseniev A. S., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. In: *Peptides: chemistry, structure and biology*/Eds Walter R., Meienhofer J. Ann. Arbor: Ann. Arbor Sci., 1975, p. 935–941.
76. 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.
77. Арсеньев А. С., Сурип А. М., Уткин Ю. Н., Цетлин В. И., Быстров В. Ф., Иванов В. Т., Овчинников Ю. А. *Биоорган. химия*, 1978, т. 4, № 2, с. 197–207.
78. 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.
79. 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. *Toxicon*, 1979, v. 17, suppl. № 1, p. 77.
80. 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., Wadström T. Oxford – New York: Pergamon Press, 1980, p. 523–530.
81. 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.
82. Ivanov V. T., Tsetlin V. I., Mikhaleva I. I., Voipina O. M., Nuriddinov A. R., Utkin Yu. N., Arseniev A. S., Pashkov V. S., Surin A. M., Bystrov V. F. In: *Peptides 1978*/Eds Kupryszewski G., Siemion I. Z. Poland: Wroc'aw University Press, 1979, p. 41–62.
83. Arseniev A. S., Pashkov V. S., Pluzhnikov K. A., Rochat H., Bystrov V. F. *Eur. J. Biochem.*, 1981, v. 118, № 3, p. 453–462.
84. Arseniev A. S., Utkin Yu. N., Pashkov V. S., Tsetlin V. I., Ivanov V. T., Bystrov V. F., Ovchinnikov Yu. A. *FEBS Lett.*, 1981, v. 136, № 2, p. 269–274.
85. Bystrov V. F., Tsetlin V. I., Karlsson E., Pashkov V. S., Utkin Yu. N., Kondakov V. I., Pluzhnikov K. A., Arseniev A. S., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. In: *Toxins as tools in neurochemistry*/Eds Hucho F., Ovchinnikov Yu. A. Berlin (West): W. de Gruyter, 1983, p. 193–233.
86. Tsetlin V., Karlsson E., Utkin Yu., Arseniev A., Pluzhnikov K., Surin A., Pashkov V., Bystrov V., Ivanov V. In: *Chemistry of peptides and proteins*/Eds Voelter W., Wünsch E., Ovchinnikov Yu., Ivanov V. B. – N. Y.: Walter de Gruyter & Co., 1982, v. 1, p. 389–398.
87. Tsetlin V. I., Karlsson E., Utkin Yu. N., Pluzhnikov K. A., Arseniev A. S., Su-

- rin A. M., Kondakov V. I., Bystrov V. F., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A.* Toxicon, 1982, v. 20, № 1, p. 83-92.
88. *Пашков В. С., Арсеньев А. С., Уткин Ю. Н., Цетлин В. И., Быстров В. Ф.* Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 5, с. 588-615.
  89. *Уткин Ю. Н., Пашков В. С., Плужников К. А., Курятов А. Б., Арсеньев А. С., Цетлин В. И., Быстров В. Ф., Иванов В. Т.* Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 4, с. 437-449.
  90. *Пашков В. С., Плужников К. А., Уткин Ю. Н., Хиниче Р., Арсеньев А. С., Цетлин В. И., Иванов В. Т., Быстров В. Ф.* Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 9, с. 1181-1219.
  91. *Tsernoglou D., Petsko G. A.* FEBS Lett., 1976, v. 68, № 1, p. 1-4.
  92. *Low B. W., Preston H. S., Sato A., Rosen L. S., Scarl I. E., Rudko A. D., Richardson J. S.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, № 9, p. 2991-2994.
  93. *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.
  94. *Lauterwein J., Lazdunski M., Wüthrich K.* Eur. J. Biochem., 1978, v. 92, № 2, p. 361-371.
  95. *Endo T., Inagaki F., Hayashi K., Miyazawa T.* Eur. J. Biochem., 1979, v. 102, № 2, p. 417-430.
  96. *Fung C. H., Chang C. C., Gupta R. K.* Biochemistry, 1979, v. 18, № 3, p. 457-460.
  97. *Galat A., Degelaen J. P., Yang C. C., Blout E. R.* Biochemistry, 1981, v. 20, № 26, p. 7415-7423.
  98. *Inagaki F., Miyazawa T., Hori H., Tamiya N.* Eur. J. Biochem., 1978, v. 89, № 2, p. 433-442.
  99. *Inagaki F., Tamiya N., Miyazawa T.* Eur. J. Biochem., 1980, v. 109, № 1, p. 129-138.
  100. *Inagaki F., Tamiya N., Miyazawa T., Williams R. J. P.* Eur. J. Biochem., 1981, v. 118, № 3, p. 621-625.
  101. *Poulsen F. M., Hoch J. C., Dobson C. M.* Biochemistry, 1980, v. 19, № 12, p. 2597-2607.
  102. *Morris A. T., Dwek R. A.* Quart. Rev. Biophys., 1977, v. 10, № 4, p. 421-484.
  103. *Лармон В. Н., Кокорин А. И., Жидомиров Г. М.* Стабильные бирадикалы. М.: Наука, 1980.
  104. *Menez A., Montenay-Garestier T., Fromageot P., Hélène C.* Biochemistry, 1980, v. 19, № 23, p. 5202-5208.
  105. *Сурин А. М., Уткин Ю. Н., Плужников К. А., Ефремов Е. С., Цетлин В. И.* Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 3, с. 342-356.
  106. *Surin A. M., Utkin Yu. N., Pluzhnikov K. A., Tsetlin V. I.* In: Toxins as tools in neurochemistry/Eds Hucho F., Ovchinnikov Yu. A. Berlin (West): W. de Gruyter, 1983, p. 171-192.
  107. *Сурин А. М., Плужников К. А., Уткин Ю. Н., Карлссон Е., Цетлин В. И.* Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 6, с. 756-766.
  108. *Thiéry C., Nabedryk-Viala E., Menez A., Fromageot P., Thiéry J. M.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1980, v. 93, № 3, p. 889-897.
  109. *Nabedryk-Viala E., Thiéry C., Menez A., Tamiya N., Thiéry J. M.* Biochim. et biophys. acta, 1980, v. 626, № 2, p. 321-331.
  110. *Inagaki F., Miyazawa T., Williams R. J. P.* Bioscience Rep., 1981, v. 1, № 9, p. 743-750.
  111. *Endo T., Inagaki F., Hayashi K., Miyazawa T.* Eur. J. Biochem., 1981, v. 120, № 1, p. 117-124.
  112. *Inagaki F., Clayden N. J., Tamiya N., Williams R. J. P.* Eur. J. Biochem., 1981, v. 120, № 2, p. 313-322.
  113. *Endo T., Inagaki F., Hayashi K., Miyazawa T.* Eur. J. Biochem., 1982, v. 122, № 2, p. 541-547.
  114. *Inagaki F., Clayden N. J., Tamiya N., Williams R. J. P.* Eur. J. Biochem., 1982, v. 123, № 1, p. 99-104.
  115. *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.
  116. *Walkinshaw M. D., Saenger W., Maelicke A.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, № 5, p. 2400-2404.
  117. *Walkinshaw M. D., Saenger W., Maelicke A.* In: Structural aspects of recognition and assembly in biological macromolecules/Eds Balaban M., Sussman J. S., Traub W., Yonath A. Rehovot and Philadelphia: Balaban ISS, 1981, v. 1, p. 313-320.
  118. *Набиев И. Р., Плужников К. А., Траханов С. Д., Ефремов Е. С., Цетлин В. И.* Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 6, с. 836-846.
  119. *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.
  120. *Lester H. J.* Gen. Physiol., 1971, v. 57, № 1, p. 255-260.
  121. *Low B. L.* In: Advances in cytopharmacology/Eds Cecarelli F., Clementi F. N. Y.: Raven Press, 1979, v. 3, p. 141-148.
  122. *Hucho F.* FEBS Lett., 1979, v. 103, № 1, p. 27-32.
  123. *Karlin A., Damle V., Hamilton S., McLaughlin M., Valderamma R., Wise D.* In: Advances in cytopharmacology/Eds Cecarelli F., Clementi F. N. Y.: Raven Press, 1979, v. 3, p. 183-188.
  124. *Oswald R. E., Changeux J.-P.* FEBS Lett., 1982, v. 139, № 2, p. 225-229.

125. *Tsellin V. I., Pluzhnikov K. A., Karelin A. A., Ivanov V. T.* In: *Toxins as tools in neurochemistry*/Eds Hucho F., Ovchinnikov Yu. A. Berlin (West): W. de Gruyter, 1983, p. 159-170.
126. *Zingsheim H. P., Barrantes F. J., Frank J., Hanicke W., Neugebauer D.-Ch.* *Nature*, 1982, v. 299, № 5878, p. 81-84.
127. *Kistler J., Stroud R. M., Klimkowsky M. W., Lalancette R. A., Fairclough R. H.* *Biophys. J.*, 1982, v. 37, № 1, p. 371-383.
128. *Sarkar N., Langley D., Paulus H.* *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, v. 74, № 3, p. 1478-1482.
129. *Paulus H., Sarkar N., Mukhejee P. K., Langley D., Ivanov V. T., Shepel E. N., Veatch W.* *Biochemistry*, 1979, v. 18, № 21, p. 4532-4536.
130. *Fisher R., Blumenthal T.* *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1982, v. 79, № 4, p. 1045-1048.
131. *Ivanov V.* In: *Peptides*/Eds Blaha K., Malon P. West Berlin: Walter de Gruyter, 1983, p. 73-89.
132. *Ovchinnikov Yu. A., Ivanov V. T., Shkrob A. M.* *Membrane active complexes*. Amsterdam: Elsevier, 1974.
133. *Veatch W., Stryer L.* *J. Mol. Biol.*, 1977, v. 113, № 1, p. 89-102.
134. *Veatch W. R., Fossel E. T., Blout E. R.* *Biochemistry*, 1974, v. 13, № 26, p. 5349-5356.
135. *Urry D. W., Long M. M., Jacobs M., Harris R. D.* *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1975, v. 264, p. 203-220.
136. *Sychev S. V., Neuskaya A. N., Jordanov S., Shepel E. N., Miroshnikov A. I., Ivanov V. T.* *Bioorgan. Chem.*, 1980, v. 9, № 1, p. 121-151.
137. *Арсениев А. С., Барсуков И. Л., Сычев С. В., Быстров В. Ф., Иванов В. Т., Овчинников Ю. А.* *Биол. мембраны*, 1984, т. 1, № 1, с. 5-17.
138. *Arseniev A. S., Bystrov V. F., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A.* *FEBS Lett.*, 1984, v. 165, № 1, p. 51-56.
139. *Eich G., Bodenhausen G., Ernst R. R. J.* *Amer. Chem. Soc.*, 1982, v. 104, № 13, p. 3731-3732.
140. *Veatch W. R., Blout E. R.* *Biochemistry*, 1974, v. 13, № 26, p. 5257-5264.
141. *Anil Kumar, Wagner G., Ernst R. R., Wuthrich K. J.* *Amer. Chem. Soc.*, 1981, v. 103, № 12, p. 3654-3658.
142. *Colonna-Cesari F., Premilat S., Hetz F., Spach G., Lotz B.* *Macromolecules*, 1977, v. 10, № 5, p. 1284-1288.
143. *Urry D. W.* *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971, v. 68, № 3, p. 672-676.
144. *Urry D. W., Goodal M. C., Glickson J. D., Mayers D. F.* *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971, v. 68, № 8, p. 1907-1911.
145. *Veatch W. R., Matheis R., Eisenberg M., Stryer L.* *J. Mol. Biol.*, 1975, v. 99, № 1, p. 75-92.
146. *Sychev S. V., Ivanov V. T.* In: *Membranes and transport*/Ed. Martonosi A. N. N. Y.: Plenum Corp., 1982, v. 2, p. 301-307.
147. *Ivanov V. T., Sychev S. V.* In: *Proc. of VIII Amer. Pept. Symp.* Rockford, Illinois: Pierce Chem. Comp., 1983.
148. *Iseli M., Wagniere G., Brahms J. G., Brahms S.* *Helv. chim. acta*, 1979, v. 62, № 4, p. 921-931.
149. *Ivanov V. T., Sychev S. V.* In: *Biopolymer complexes*/Eds Snatzke G., Bartmann W. N. Y.: J. Wiley, 1982, p. 107-125.
150. *Urry D. W., Prasad K. U., Trapane T. L.* *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1982, v. 79, № 2, p. 390-394.
151. *Urry D. W., Walker J. T., Trapane T. L.* *J. Membrane Biol.*, 1982, v. 69, № 3, p. 225-231.
152. *Urry D. W., Shaw R. G., Trapane T. L., Prasad K. U.* *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1983, v. 114, № 1, p. 373-379.
153. *Urry D. W., Trapane T. L., Romanowski S., Bradley R. J., Prasad K. V.* *Int. J. Peptide and Protein Res.*, 1983, v. 21, № 1, p. 16-23.
154. *Spisni A., Pasquali-Ronchetti I., Casali E., Lindner L., Cavatorta P., Masotti L., Urry D. W.* *Biochim. et biophys. acta*, 1983, v. 732, № 1, p. 58-68.

Поступила в редакцию  
24.IV.1984

#### IMPACT OF NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE ON STRUCTURE-FUNCTIONAL RELATIONSHIP STUDY OF PROTEINS AND PEPTIDES

BYSTROV V. F.

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

NMR spectroscopy provides a unique means to study molecular conformation, mechanisms of action and structure-function relationships for peptides and proteins in solution under conditions approaching those of their physiological environment. Development of NMR techniques, especially directed to the peptide and protein conformational analysis, is considered under the topics of two-level signal assignment and structural significance of homo- and heteronuclear spin-spin couplings. The results of NMR conformational analysis are presented for solution spatial structure of valinomycin and gramicidin A antibiotics, honey-bee neurotoxin apamin, scorpion insectotoxin I<sub>5</sub>A and snake venom neurotoxins of «short» and «long» types. The structure-function relationships are discussed for these biologically active molecules.