



УДК 575.854:591.145.2-546.087

РАЦИОНАЛЬНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ ТОКСИНОВ ИЗ ЯДА СКОРПИОНОВ

© 1997 г. В. А. Жаравин, А. П. Голованов, А. С. Арсеньев[#]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 14.10.96 г. Принята к печати 03.03.97 г.

Описан теоретический метод рационального проектирования “универсального” токсина скорпиона с более широким спектром действия на K^+ -каналы и более стабильной α/β -укладкой по сравнению с природными гомологами. На основе анализа молекулярных гидрофобных потенциалов (МГП) для семейства из пяти коротких токсинов скорпиона выявлены присутствующие в структурах закономерности. Анализ карт двухмерных внутримолекулярных МГП-контактов позволил определить аминокислотные остатки токсинов, ответственные за укладку белка и/или проявление его специфической функции. Данные о структурно-функциональной роли остатков, полученные теоретически, сравниваются с экспериментальными данными по мутагенезу харибдотоксина. Основываясь на результатах расчета по методу МГП и применяя теорию молекулярной эволюции белков в качестве дополнительного критерия отбора мутаций, получили аминокислотную последовательность и пространственную структуру “универсального” токсина скорпиона.

Ключевые слова: рациональное проектирование белков; гидрофобные взаимодействия; токсины скорпиона.

Уникальным свойством яда скорпионов является наличие в его составе гомологичных токсинов, действующих избирательно только на один из классов животных: млекопитающих, насекомых или ракообразных [1]. Аминокислотные последовательности коротких токсинов (37–39 остатков) весьма гомологичны, и для некоторых установлена пространственная структура: AgTX [2], ChTX [3], MgTX [4], OSK1 [5], SXM [6]. В растворе или кристалле эти токсины имеют характерный тип (α/β) укладки полипептидной цепи в пространстве: антипараллельный β -слой из трех тяжей соединяется с α -спиралью тремя дисульфидными связями. Токсины скорпиона встраиваются во внешнюю полость рецепторов (по-видимому, без существенной перестройки свойственной им пространственной структуры) и препятствуют прохождению ионов через K^+ -каналы [7]. Поэтому токсины скорпионов могут служить инструментами исследования физиологической роли K^+ -каналов в различных тканях [8]. Используя токсин как структурную линейку, можно измерить область поры канала [9].

Сокращения: МГП – молекулярный гидрофобный потенциал; PDB (Protein Data Bank) – Брукхэйвенский банк белковых структур; OSK1 – токсин скорпиона *Orthochirus scrobiculosus*; SXM – ноксиотоксин; ChTX – харибдотоксин; MgTX – марготоксин; AgTX – агиотоксин; UTX – “универсальный” токсин скорпиона; PSC – коэффициент соответствия гидрофобности остатка его окружению.

[#]Автор для переписки.

В ходе естественной эволюции возникло большое количество специализированных K^+ -каналов – рецепторов токсинов. Известно несколько основных разновидностей таких рецепторов, различающихся по типу активации: Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы тканей позвоночных животных [10] и клеток крови [11] разной степени проводимости (высокой, средней и низкой), шейкеровские (Shaker) K^+ -каналы, потенциалактивируемые K^+ -каналы лимфоцитов [12] и др. Параллельно в ходе эволюции возникли токсины, как специфические для конкретного K^+ -канала, так и действующие на несколько рецепторов. Короткие токсины скорпиона можно разделить на несколько подгрупп (3–4) с гомологичностью между группами 40% и внутри подгрупп 70–80%. Несмотря на то что токсины, принадлежащие к каждой из подгрупп данного семейства, имеют высокую степень гомологии, они могут эффективно взаимодействовать с несколькими типами рецепторов [13], т.е. специфичность связывания с каким-то одним типом рецептором не определяется принадлежностью токсина к конкретной подгруппе [14].

По-видимому, универсальные токсины имеют большую биологическую ценность для скорпионов ввиду значительного разнообразия их рецепторов-мишеней, и можно было ожидать появления таких токсинов в ходе эволюции. В данной работе мы попытались создать модель подобного “универсального” токсина, применяя рациональные методы проектирования белков. Благодаря

своим небольшим размером, известной пространственной структуре и достаточно подробно охарактеризованным (в том числе с привлечением данных по мутагенезу отдельных аминокислотных остатков) структурно-функциональным взаимосвязям токсина скорпиона являются удобным объектом для применения метода рациональной эволюции белков.

Считается, что изменение белков происходит либо в результате точечной невырожденной мутации, либо путем генетической рекомбинации участков генома. При этом во многих случаях новый белок содержит элементы пространственной структуры своих предшественников [15]. Согласно теории Кимуры о нейтральном характере мутаций при молекулярной эволюции белков, генетические кодоны в ходе эволюции увеличивают степень своей устойчивости против случайной мутации [16]. Новые белки "проходят тестирование" на биологическую функцию в различных организмах и после селекции продолжают участвовать в эволюции [17]. Методами генетической инженерии можно продолжить эволюцию конкретного белка, руководствуясь правилами отбора, похожими на законы естественной эволюции, в частности вытекающими из теории Кимуры. В результате следует ожидать, что синтезированный белок будет обладать усиленной функцией. В последнее время было много сообщений об удачных заменах отдельных аминокислотных остатков в белках, приводящих к повышению стабильности и/или модификации функции белка в заданном направлении [18–20]. Однако в этих исследованиях выбор мутаций производился по методу "проб и ошибок", причем большая часть мутаций касалась отдельных аминокислотных остатков. Так или иначе, с использованием мутагенеза можно синтезировать новый токсин с измененной специфичностью к какому-то одному рецептору. Возможен также поиск мутантов, действующих на несколько типов рецепторов.

Для того чтобы перейти к применению более рациональных методик осуществления мутагенеза, необходимо изучить естественные принципы отбора и выбрать из них соответствующие поставленной задаче. В качестве примера подобной задачи можно назвать изменение спектра специфичности белка. Существенным фактором при отборе более эффективного белка помимо усиления его способности к выполнению определенной функции является его структурная стабильность. В свою очередь стабильность той или иной структурной организации белка определяется наличием вполне определенных структурных элементов, таких, как гидрофобные кластеры и солевые мостики, заряженные боковые цепи, гидрофобные и гидрофильные контакты с характерной периодичностью вдоль аминокислотной последовательно-

сти, N- и C-концевые элементы α -спиралей, плотности упаковки аминокислотных остатков в белке и др. [21].

Руководствуясь современными представлениями о факторах, стабилизирующих пространственную структуру белков, и основываясь на конкретном выбранном типе пространственной структуры белка с известной функцией, можно продолжить эволюцию рациональным способом и получить "универсальный белок" с широким спектром специфичности, т.е. обладающий расширенной функциональной активностью и повышенной стабильностью.

В настоящей работе мы попытаемся продолжить эволюцию коротких токсинов скорпиона, проведя теоретической одновременный мутагенез большого числа остатков рациональным способом в соответствии с теорией увеличения устойчивости генетических кодонов, обеспечив при этом сохранение и дополнительную стабилизацию структуры токсина и усиление его функции связывания с K^+ -каналами. Для проведения такой эволюции необходимо решить две задачи:

1) выявить аминокислотные остатки, ответственные за конкретный тип пространственной структуры белка. При замене таких остатков мы будем стараться повысить общую стабильность пространственной структуры белка;

2) выявить аминокислотные остатки, ответственные за взаимодействия с рецепторами. При замене таких остатков мы будем стараться повысить способность токсинов связываться с различными рецепторами.

Следует отметить, что большинство инвариантных остатков нельзя заменять, так как они ответственны либо за сохранение структуры, либо за осуществление функции. Поэтому замены должны касаться в основном вариабельной части белка.

Таким образом, мы рассчитываем получить последовательность и пространственную структуру токсина, являющегося продуктом следующего "витка" эволюции (имеется в виду учет результата будущих случайных мутаций). Так как этот токсин создается на основе стабилизирующих и функциональных элементов, присутствующих в нескольких представителях данного семейства токсинов, то можно ожидать, что он кажется более универсальным, т.е. будет обладать более широким, чем у его предшественников, спектром действия к нескольким типам K^+ -каналов (т.е. обладать расширенной функциональной активностью), а усиление внутримолекулярных взаимодействий, ответственных за α/β -укладку полипептидной цепи этого токсина, приведет к более стабильной пространственной структуре.

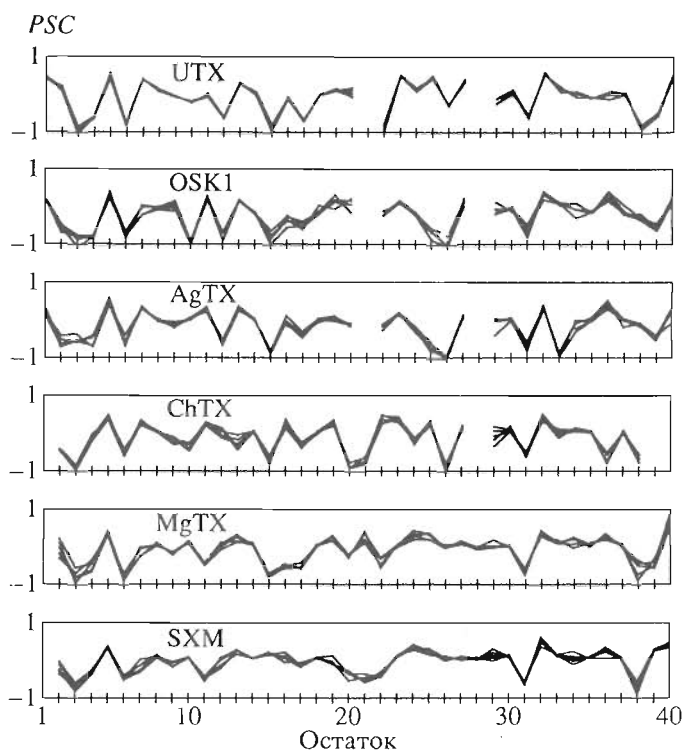


Рис. 2. Одномерные профили *PSC* семейства токсинов, рассчитанные для наборов пространственных структур в гидратных оболочках.

Двумерные карты с МПП-значениями, превышающими пороговое значение, очень похожи для всех токсинов (рис. 3). Прежде всего можно заметить, что боковые цепи (карта SS) участвуют в гидрофобных взаимодействиях приблизительно в 10 раз чаще, чем в гидрофильных, а для основной цепи (карта ВВ) ситуация обратная. Между боковыми и основными цепями (карта СВ) много “неблагоприятных” контактов. Плюсы и минусы имеют те же значения, что и для *PSC*-профиля (рис. 2).

Характерный узор, присутствующий на картах МПП-контактов, как и на обычных картах пространственной близости остатков, определяется гомологией первичной структуры, наличием похожих элементов вторичной структуры и типом их укладки в пространстве. Различия в узорах на картах разных токсинов объясняются в основном различиями в гидрофобностях боковых цепей остатков и в их конформациях, пропусками внутри аминокислотной последовательности или наличием дополнительных С-, N-концевых остатков и связанными с этим различиями в укладке основной цепи. Следует отметить, что инвариантные контакты, т.е. присутствующие во всех токсинах, часто образованы негомологичными остатками (например, остатки 2 и 4 на рис. 1). При условии приблизительно одинаковой укладки основной цепи для рассматриваемых токсинов мож-

но попытаться найти различия в боковых цепях этих токсинов.

На карте SS (рис. 3б) видны многочисленные гидрофобные контакты между боковыми цепями остатков, формирующих плотно упакованный гидрофобный кластер, характерный для токсинов скорпиона. Этот кластер образован в основном боковыми цепями инвариантных остатков цистеина. Гидрофобный кластер соединяет β -слой, состоящий из тяжей $\beta 1$ (остатки 2–6), $\beta 2$ (25–31) и $\beta 3$ (34–40), с α -спиралью (10–22) (см. также рис. 1 и рис. 4а–4в, где видны элементы вторичной структуры токсинов). Примечательно, что на карте инвариантных SS-контактов (рис. 3б) “неблагоприятные” контакты окружены или соседствуют с контактами гидрофобного кластера.

На карте ВВ (рис. 3б) хорошо заметны характерные гидрофильные контакты внутри α -спирали. Так как α -спираль семейства токсинов (кроме харибдотоксина) содержит изгиб в центральной части, часть ВВ-контактов в этом месте отсутствует. При формировании β -тяжей образуются гидрофильные и гидрофобные ($i, i + 2$) контакты (рис. 3б, SS и ВВ). Эта картина соответствует периодичности типа НРНН или РНРН гидрофильных (Р) и гидрофобных (Н) остатков, обнаруженной [26] для β -тяжей на основе статистического анализа большого числа белков. Для α -спирали

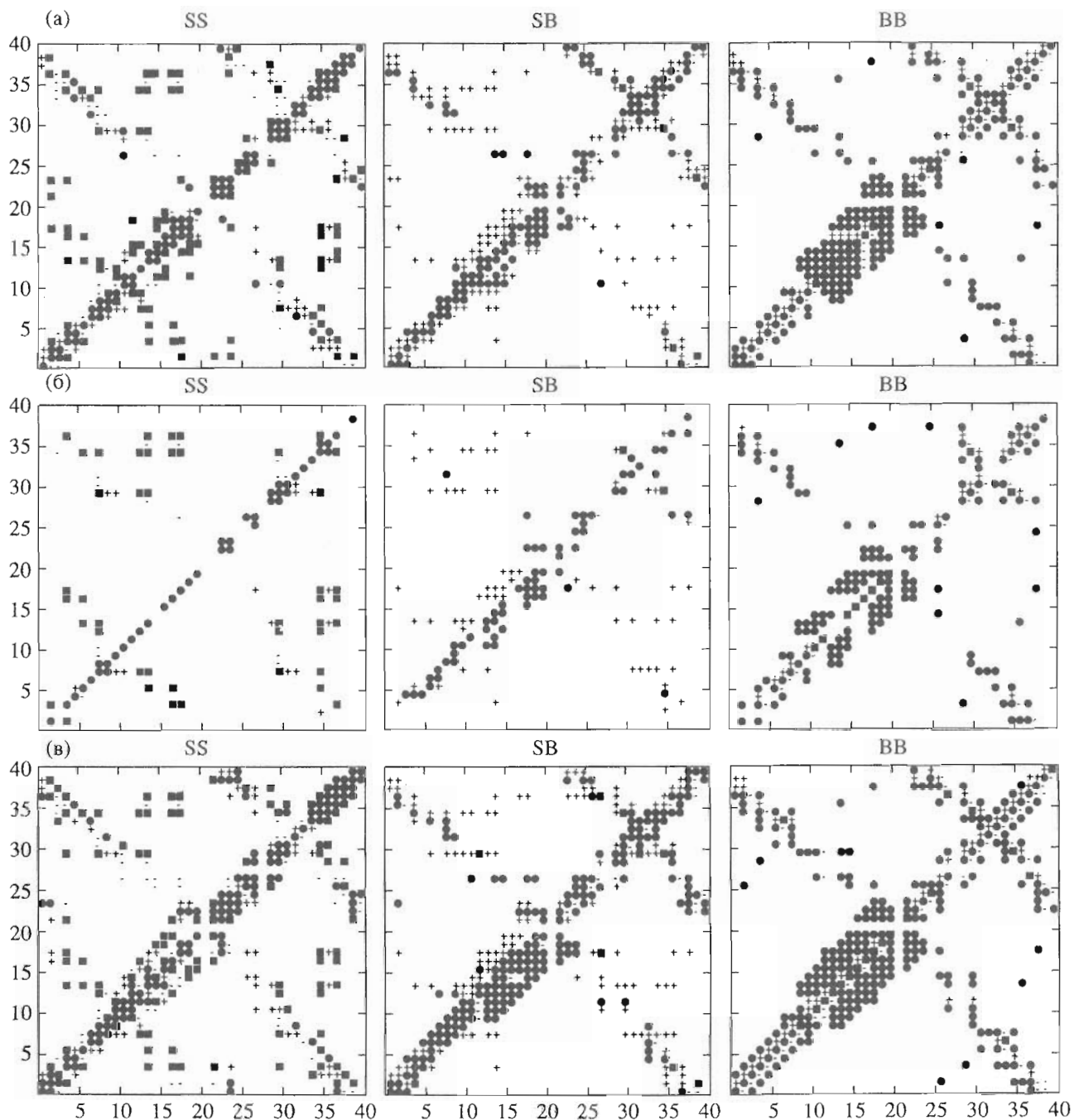


Рис. 3. Симметричные двумерные карты МГП SS-, SB-, BB-контактов (S – боковые цепи, В – остов цепи): токсина OSK1 (а), инвариантных для семейства токсинов (б), “универсального” токсина (в). Показаны гидрофобные (■), гидрофильные (●) и “неблагоприятные” (+/-) контакты между остатками.

характерна периодичность типа RHPH или HPHP [26]. Кроме того, мы обнаружили сильные гидрофильные BB-контакты между β -шпилькой (остатки 28–33) и β 1-тяжем (β -шпилька соединяет тяжи β 2 и β 3). Эти контакты наряду с дисульфидными и водородными связями дополнительно стабилизируют взаимное расположение β -шпильки и α -спирали. Остатки, составляющие изгибы

основной цепи (повороты 7–9, 25–26, выступ 36–38 и β -изгиб 29–32), содержат характерные “неблагоприятные” BB-контакты ($i, i + 1$). В большинстве токсинов присутствуют характерные “неблагоприятные” BB-контакты с пролином в месте изгиба α -спирали (например, в OSK1 рис. 3а).

Из двумерных карт рис. 3 суммированием по вертикальной оси получены профили МГП-вкла-

дов в гидрофобные (SS) и гидрофильные (BB) внутримолекулярные взаимодействия аминокислотных остатков для семейства токсинов (рис. 5). Эти профили используются для дополнительной оценки интенсивности гидрофобных/гидрофильных контактов отдельных аминокислотных остатков токсинов.

Чтобы проанализировать структурно-функциональное значение каждого аминокислотного остатка, необходимо определить типы всех взаимодействий этого остатка и выделить из них достаточно интенсивные (т.е. выше порога на двухмерной карте) и присутствующие во всех токсинах. Следует отметить, что последнее условие является очень сильным “фильтром” и выделяет контакты, без которых типичная α/β -укладка токсина скорпиона невозможна. Инвариантные контакты между остатками, присутствующие во всех пяти белках, показаны на рис. 4а–4в жирными линиями. Здесь хорошо видна группа контактов, соответствующая гидрофобному кластеру (рис. 4а), многочисленные гидрофильные контакты α -спирали и β -слоя (рис. 4б) и “неблагоприятные” контакты активной области токсинов (рис. 4в). Взаимное расположение гидрофобного ядра и активной области токсинов, принимающей участие в связывании с рецептором, показано на рис. 6.

Как и в работе [23], мы обратим внимание на два типа остатков – структурные (S) и активные (A) (см. “Экспериментальную часть”).

Из анализа карты инвариантных контактов боковых цепей следует, что во всех токсинах боковые цепи остатков цистеинов 8, 14, 18, 30, 35, 37 и остатков 2, 4, 6, 13, 17 имеют гидрофобные контакты – это структурные остатки (черные квадратики на рис. 3б, SS). Боковые цепи этих остатков формируют гидрофобный кластер. Следует также отметить присутствие в части структур стабилизирующих мотивов типа “шапочка” (cap) на N- и C-концах α -спирали. Необходимо обеспечить наличие этих мотивов, так как они предотвращают раскручивание α -спирали и ее удлинение за пределы N- и C-шапочек [25]. Мотивы имеют шаблоны: для N-шапочек это T⁹-S¹⁰-X¹¹-X¹²-Q¹³ (иногда T¹⁰, E¹³ или сходные по гидрофобности остатки), для C-шапочек – K¹⁹-X²⁰-X²¹-X²²-G²³ [27]. Данные мотивы имеют пару характерных водородных связей: в N-шапочках – между C=O боковой цепи остатка Q¹³ и H-N остатков T⁹ и S¹⁰, в C-шапочках – между C=O остатков K¹⁹ и X²⁰ и H-N остатка G²³. Остатки, участвующие в образовании шапочек, на рис. 1 обозначены буквами С и N. Отметим, что устранение N-шапочки α -спирали (замена остатка глутамина на аланин), описанное в работе [28], увеличило конформационную энергию пространственной структуры белка на 2.0 ккал/моль, а устранение C-шапочки (замена глицина на аланин) – на 3.0 ккал/моль [29].

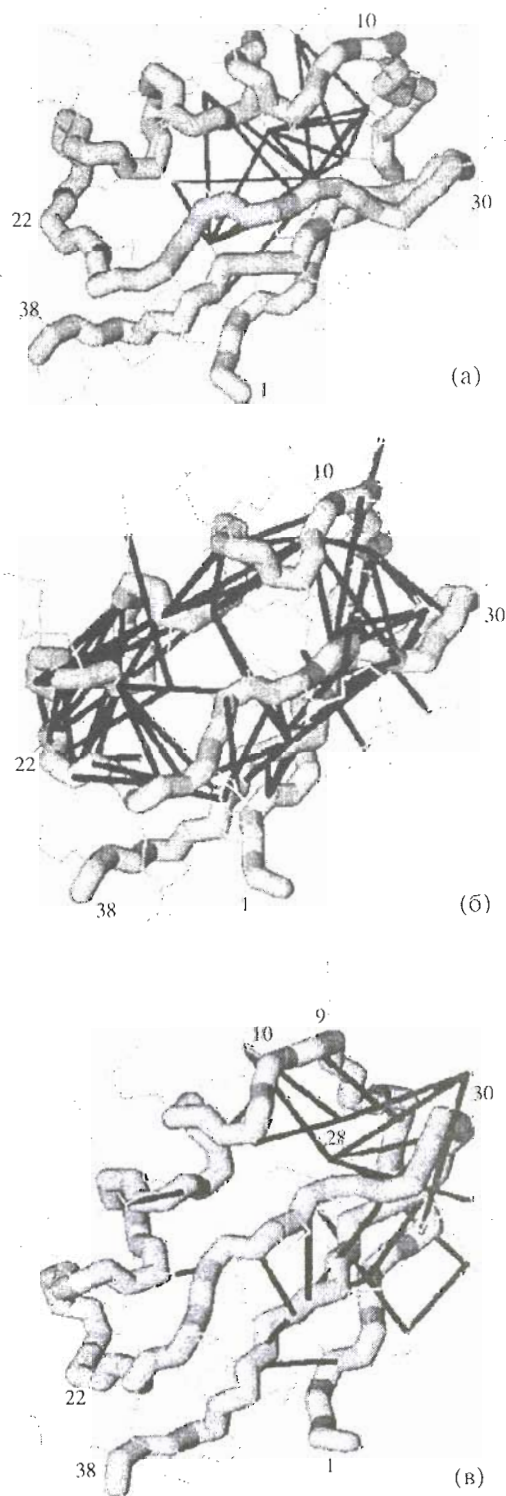


Рис. 4. Гидрофобные (а), гидрофильные (б) и “неблагоприятные” (в) контакты, инвариантные для всех токсинов скорпиона (темные линии) в структуре токсина OSK1. Основная цепь показана серой трубой (боковые остатки – тонкими серыми линиями); цифры – номера некоторых остатков. Ракурс структуры немного изменен для лучшего представления контактов.

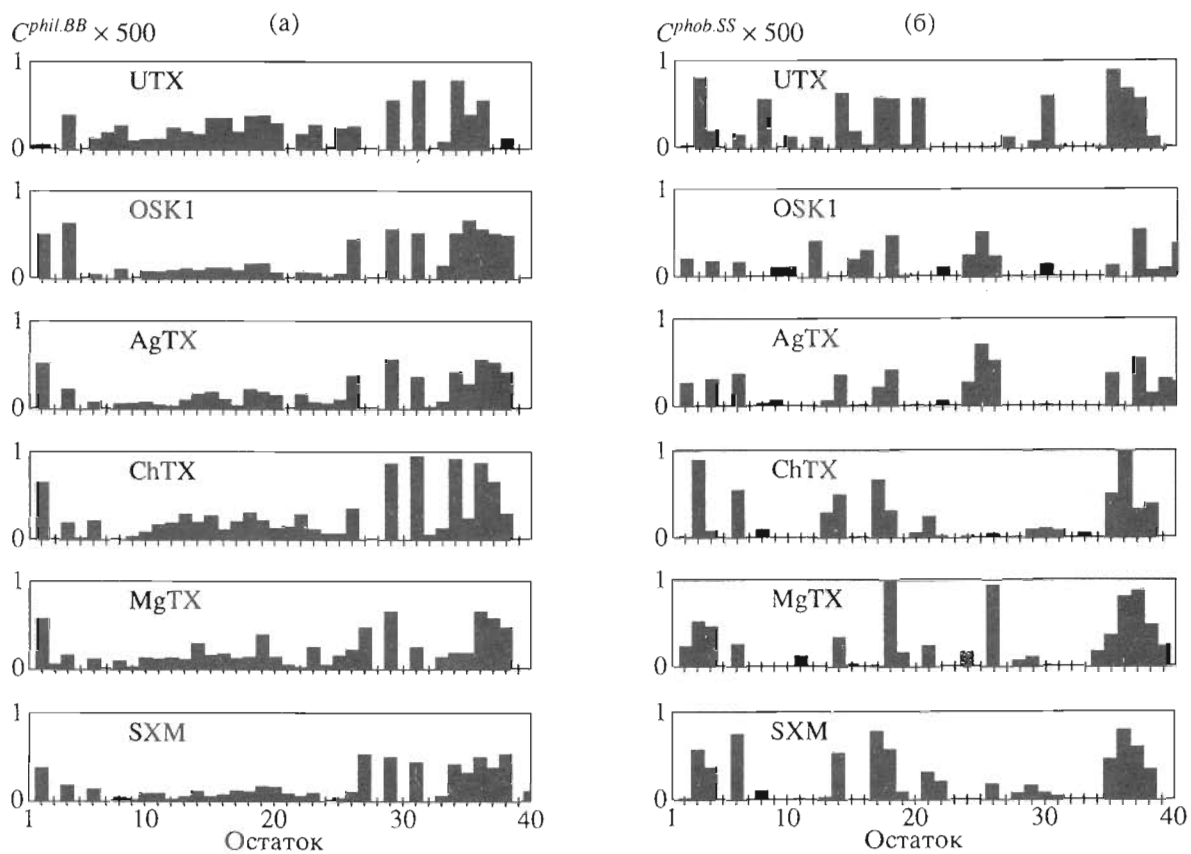


Рис. 5. Одномерные профили МГП-вкладов аминокислотных остатков для семейства токсинов: а – гидрофобные (SS); б – гидрофильные (BB) внутримолекулярные взаимодействия. Показаны максимальные значения по набору структур.

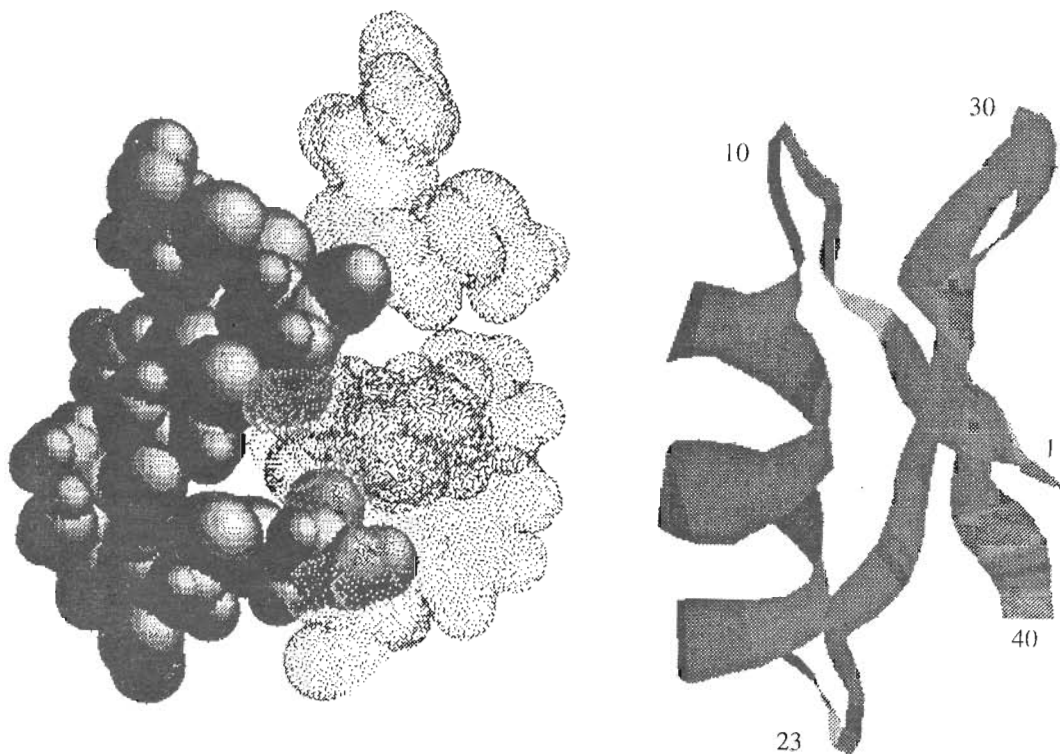


Рис. 6. Взаимное расположение гидрофобного ядра (темные сферы) и активной области связывания (серые сферы). Справа лентой показана основная цепь в той же ориентации и масштабе. Цифры – номера некоторых остатков.

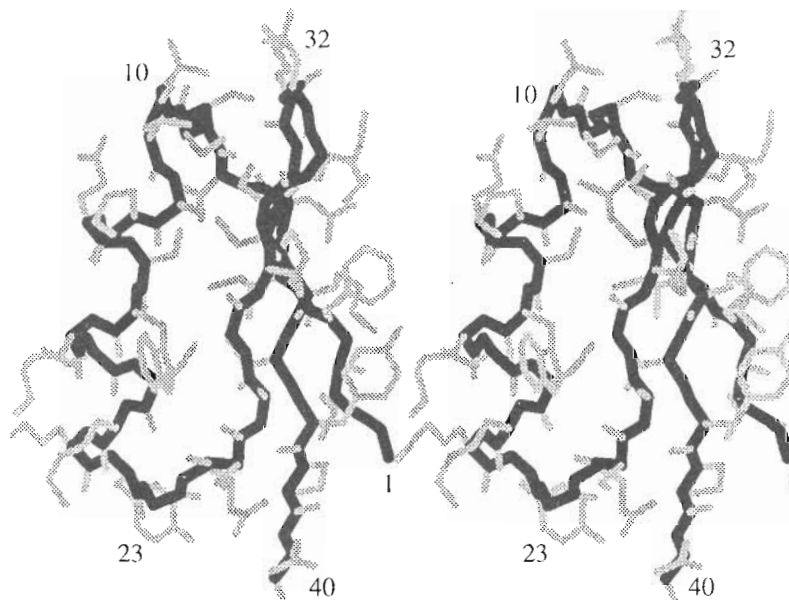


Рис. 7. Стереопара модели структуры UTX. Основная цепь показана черной линией, боковые цепи – серыми линиями.

Поэтому, в особенности для коротких спиралей, концевые остатки играют большую роль, чем внутренние, так как замена последних увеличивает конформационную энергию структуры лишь на 0.5 ккал/моль [30]. Остатки, необходимые для образования шапочек, могут быть также отнесены к структурным.

Активные остатки (5, 9, 10, 11, 27, 29, 31, 32, 34, 36, 38) имеют “неблагоприятные” SS-контакты (на рис. 3б, SS они помечены знаками “+” и “-”). Структурные и активные остатки, общие для семейства токсинов, показаны на рис. 1 в строке “S/A”. Наличие у инвариантного остатка “неблагоприятных” контактов может означать, что он важен для специфической функции, т.е. связывания [23]. Чтобы определить области токсина, потенциально активные для связывания, необходимо выбрать активные остатки, имеющие наибольшее количество “неблагоприятных” контактов и компактно расположенные на поверхности токсина. В результате получаем две группы активных остатков: 9, 10, 11 и 5, 27, 29, 31, 32, 34, 36, 38.

Функциональная активность большинства остатков харибдотоксина охарактеризована [31]. Показано, что 5 критических остатков (29, 31, 32, 36, 38 по нумерации рис. 1) образуют активный центр и непосредственно связываются с “дном” рецептора шейкерского K^+ -канала, 8 остатков (2, 3, 11, 24, 25, 26, 33, 39) окружают этот активный центр, а остатки 9, 10 контактируют с боковой поверхностью рецептора [32]. В связывании с Ca^{2+} -активируемым K^+ -каналом высокой проводимости участвуют в основном эти же остатки [33]. Для 17 остатков (4, 5, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16,

17, 19, 20, 21, 22, 23, 33) показано, что их замена не влияет на связывание токсина с рецептором.

Интересно, что список идентифицированных нами активных остатков практически совпал со списком критических остатков харибдотоксина (29–38 и 9–10) [32]. К сожалению, данные мутагенеза имеются лишь для харибдотоксина, и мы не можем проверить наши выводы на данных по другим токсинам.

С помощью метода последовательных мутаций структуры OSK1 (см. “Экспериментальную часть”) получена последовательность “универсального” токсина (UTX) (рис. 1). В соответствии с этой последовательностью смоделирована пространственная структура UTX. Конформационная энергия полученной структуры UTX равна –28 ккал/моль, что меньше конформационных энергий природных токсинов после минимизации (в диапазоне 24–90 ккал/моль). В данном случае сравнение энергий вполне информативно, учитывая высокую степень гомологии токсинов. Стереорепрезентация полученной структуры UTX приведена на рис. 7. Результаты расчетов МГП-величин для UTX приведены на рис. 3в и рис. 4 (вверху) для сравнения с аналогичными результатами для природных токсинов. Из рис. 4 следует, что в UTX гидрофобные SS-контакты несколько больше по абсолютной величине, чем в исходном токсине OSK1, а гидрофильные ВВ-контакты для разных токсинов практически не различаются. Первое должно соответствовать увеличенной стабильности UTX, а второе соответствует похожей α/β -укладке аминокислотной последовательности всех коротких токсинов

скорпиона. Кроме того, на двумерной карте МГП-контактов для UTX (рис. 3в) заметно наличие дополнительных (по сравнению с OSK1) гидрофобных и гидрофильных контактов, характерных для β -слоев и соответствующих мотивам С- и N-шапочек α -спирали (см. выше).

Таким образом, мы идентифицировали структурные и функциональные остатки семейства из пяти гомологичных белков из ядов скорпиона и получили модельную структуру токсина, подобного исходным, но, согласно нашим оценкам, более стабильного и обладающего более широким спектром действия на K^+ -каналы и, следовательно, повышенной функциональной активностью.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Координаты токсина OSK1 яда скорпиона *Orthochirus scrobiculosus* получены нами [5] (структура депонирована в PDB под именем ISCO). Координаты коротких токсинов скорпиона AgTX, ChTX, MgTX и SXM взяты из Брукхэйвенского банка белковых структур [34].

Метод расчета молекулярных гидрофобных потенциалов (МГП) подробно описан в [35]. В данной работе использовалась двухцентровая модификация метода МГП [23]. По этому методу оценивалась величина гидрофобности/гидрофильности контактов между боковыми цепями аминокислот (SS), боковая цепь – основная цепь (BS) и между основными цепями аминокислот (BB). Таким образом, при расчете МГП-значений для каждого остатка использовались два центра – геометрические центры основной и боковой цепи. При анализе карт МГП-контактов для боковых (SS) и основных (BB) цепей анализ внутримолекулярных взаимодействий более детален, чем в случае обычной карты пространственной близости остатков [36].

Величина P_{ij} равна МГП, созданному всеми атомами k остатка i . Расчет P_{ij} производился дважды – в геометрических центрах боковой (S) и основной (B) цепи аминокислотного остатка j – согласно формуле

$$P_{ij} = \sum_k^{N_i} f^k \exp[-r(k, j)/R_{dec}],$$

где i – исходный остаток; j – целевой остаток; f^k – константа гидрофобности атома k , принадлежащего к остатку i ; $r(k, j)$ – расстояние между геометрическим центром (S или B) остатка j и центром атома k ; N_i – число атомов в остатке i ; $R_{dec} = 1 \text{ \AA}$ – характерный радиус спадания МГП. Атомные константы гидрофобности f^k рассчитывались на основании коэффициентов распределения большого числа химических соединений в системе октанол–вода [37]. Контакт между двумя центрами i

и j (см. выше) считался гидрофобным, если P_{ij} и $P_{ji} > 0.001$; гидрофильным, если P_{ij} и $P_{ji} < -0.001$; “неблагоприятным”, если P_{ij} и P_{ji} были разных знаков, т.е. гидрофобная группа атомов контактировала с гидрофильной, а $|P_{ij}|, |P_{ji}| > 0.001$.

Вклады C_j^{phob} , C_j^{phil} и C_j^{unfav} аминокислотных остатков j соответственно в гидрофобные, гидрофильные и “неблагоприятные” внутримолекулярные взаимодействия рассчитывали так же, как в работе [23]:

$$C_j^{phob} = \sum_i (P_{ij} \times P_{ji}), \quad \text{если } P_{ij}, P_{ji} > 0.001;$$

$$C_j^{phil} = \sum_i (P_{ij} \times P_{ji}), \quad \text{если } P_{ij}, P_{ji} < -0.001;$$

$$C_j^{unfav} = \sum_i (P_{ij} \times P_{ji}),$$

$$\text{если } (P_{ij} \times P_{ji}) < 0 \text{ и } |P_{ij}|, |P_{ji}| > 0.001.$$

Величина коэффициента соответствия гидрофобности остатка j его окружению PSC рассчитывалась по формуле

$$PSC_j = \sum_k^{N_j} f_j^k \sum_m^{i \neq j} f_i^m \exp[-r(k, m)/R_{dec}],$$

где f_j^k – константа гидрофобности атома k , принадлежащего к остатку j ; f_i^m – константа гидрофобности атома m , принадлежащего к остатку i ; $r(k, m)$ – расстояние между атомами k и m ; N_j – число атомов в остатке j .

В PDB-файлах для всех рассматриваемых токсинов присутствовало несколько моделей пространственных структур. Карты МГП-контактов рассчитывали для всех моделей, а в дальнейшем анализировали карту контактов с максимальными величинами для каждого контакта по набору структур. Перед сравнением двумерных карт семейства токсинов их последовательности были выровнены по принципу PSC -соответствия, как показано на рис. 1.

Взаимодействия между боковыми и основными цепями остатков всех структур классифицировали на три типа: гидрофобные, гидрофильные и “неблагоприятные”. Первоначально взаимодействия, стабилизирующие укладку белка, были разделены на гидрофобные и гидрофильные. Далее из них были выделены инвариантные для всего семейства и специфические для каждого токсина. Контакт считали инвариантным в семействе токсинов, когда он присутствовал во всех структурах данного семейства и его тип не менялся. При этом рассматриваемые остатки не обязательно были гомологичны. Неинвариантными считались контакты, присутствующие лишь в некоторых токсинах из семейства. Предполагалось, что инвариантные контакты важны для поддержания

типичной укладки белка и проявления функции связывания с рецептором, а инвариантные ответственные за отличия в специфичности токсинов по отношению к рецепторам.

Как и в работе [23], остаток считался структурным (S), если его вклад в гидрофобные взаимодействия внутри молекулы высок. Структурные остатки для коротких токсинов скорпиона отвечают за α/β -тип сворачивания молекулы. Аминокислотный остаток считался принадлежащим к гидрофобному кластеру, если он участвует в гидрофобных взаимодействиях с несколькими остатками. Инвариантный остаток считался активным (A), если он имеет "неблагоприятный" контакт и не принадлежит к типу (S). Чтобы определить активные области токсина, участвующие в связывании с рецептором, необходимо выбрать из активных остатков остатки, имеющие наибольшее количество "неблагоприятных" контактов и образующие компактные области на поверхности токсина. При этом поверхность остатка, доступная растворителю, должна быть больше 30 \AA^2 .

Для расчета целесообразности замены аминокислотного остатка мы использовали следующую формулу:

$$F_j = k^v v_j / v_{\max} + k^c C_j^{\text{phob}} / C_{\max}^{\text{phob}}, \quad k^v + k^c = 1,$$

где k^v и $k^c = 0.5$ – весовые коэффициенты для баланса "устойчивости" v_j аминокислотного остатка j к случайным мутациям (рассчитанные в работе [38]) и вклада этого остатка C_j^{phob} во внутримолекулярные гидрофобные взаимодействия соответственно; оба вклада нормировали на соответствующие максимальные значения: v_{\max} – максимальное значение v_j , а C_{\max}^{phob} – максимальное значение C_j^{phob} по всем структурам семейства. В качестве замены для остатка исходной последовательности (OSK1) выбирался аминокислотный остаток последовательности того токсина семейства, который имеет максимальное значение F_j во всем наборе структур. Все остатки аминокислотной последовательности OSK1, за исключением инвариантных, были подвергнуты таким теоретическим заменам для получения последовательности UTX.

Выравнивание последовательностей по одномерным профилям гидрофобности и все вычисления МПП были выполнены посредством программы HI-EXPO. Моделирование мутаций, минимизация и вычисление конформационной энергии производились в программе SYBYL6.2 [39]. В качестве стратегии теоретических мутаций была выбрана процедура программы SYBYL последовательной замены боковых цепей пространственной структуры OSK1 в соответствии с аминокислотной последовательностью UTX. Перед вычисле-

нием энергии все пространственные структуры были подвергнуты энергетической минимизации без ограничений со следующими параметрами: 50 шагов устранения стерических наталкиваний, 100 шагов алгоритма POWELL, диэлектрическая постоянная среды $\epsilon = 80$, потенциал силового поля AMBER без учета зарядов. Рисунки структур были получены в программе MOLMOL2.20 [40].

Работа выполнена в ИБХ РАН на установке "Комплекс ЯМР-спектроскопии" (Министерства науки России грант № 96-03-08) по программе "Белковая инженерия" (грант ГНТП № 03.0002.Н-319) при частичном финансировании РФФИ (грант № 95-04-12648а).

Авторы выражают признательность Р.Г. Ефремову за ряд ценных замечаний, высказанных при чтении рукописи. Авторы также благодарны фирме TRIPOS за предоставленную программу SYBYL6.2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987. С. 283.
2. Kreizel A.M., Kasibhatla C., Hidalgo P., Mackinnon R., Wagner G. // Protein Data Bank. 1995. Код белка 1AGT.
3. Bontems F., Gilquin B., Roumestand C., Menez A., Toma F. // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 7756–7764.
4. Johnson B.A., Stevens S.P., Williamson J.M. // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 8146–8159.
5. Jaravine V.A., Nolde D.E., Reibarkh M.J., Korolkova Y.V., Kozlov S.A., Pluzhnikov K.A., Grishin E.V., Arseniev A.S. // Biochemistry. 1997. V. 36. P. 1223–1232.
6. Dauplas M., Gilquin B., Possani L.D., Gurrola-Briones G., Roumestand C., Menez A. // Protein Data Bank. 1996. Код белка 1SXM.
7. Giangiacomo K.M., Garcia M.L., McManus O.B. // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 6719–6727.
8. Leonard R.J., Garcia M.L., Slaughter R.S., Reuben J.P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 10 094–10 098.
9. MacKinnon R., Heginbotham L., Abramson T. // Neuron. 1990. V. 5. P. 767–771.
10. Moczyldovsky E., Lucchesi K., Ravindran A. // J. Membr. Biol. 1988. V. 105. P. 95–98.
11. Wolff D., Cecchi X., Spalvins A., Canessa M. // J. Membr. Biol. 1988. V. 106. P. 243–247.
12. Levis R.S., Cahalan M.D. // Science. 1988. V. 239. P. 771–773.
13. Dauplas M., Gilquin B., Possani L.D., Gurrola-Briones G., Roumestand C., Menez A. // Biochemistry. 1995. V. 34. P. 16 563–16 573.
14. Garcia M.L., Calvo M.G., Hidalgo P., Lee A., MacKinnon R. // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 6834–6839.

15. Эйген М. Самоорганизация материи и эволюция биологических макромолекул: Пер. с англ. М.: Мир, 1973.
16. Кимура М. Молекулярная эволюция: теория нейтральности: Пер. с англ. М.: Мир, 1985.
17. Грант В. Эволюция организмов: Пер. с англ. М.: Мир, 1991.
18. Zaghouani H., Steinman R., Nonacks R., Shah H., Gerhard W., Bona C. // *Science*. 1993. V. 259. P. 224–227.
19. Hynes T.R., Kautz R.A., Goodman M.A., Gill J.F., Fox R.O. // *Nature (London)*. 1989. V. 339. P. 73–76.
20. Yamada T., Uyeda A., Kidera A., Kikuchi M. // *Biochemistry*. 1994. V. 33. P. 11 678–11 683.
21. Cordes M.H.J., Davidson A.R., Sauer R.T. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1996. V. 6. P. 3–10.
22. Efremov R.G., Alix A.J.P. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1993. V. 11. P. 483–507.
23. Golovanov A.P., Efremov R.G., Jaravine V.A., Vergoten G., Arsenyev A.S. // *FEBS Lett.* 1995. V. 375. P. 162–166.
24. Efremov R.G., Golovanov A.P., Vergoten G., Alix A.G.P., Tsetlin V.I., Arseniev A.S. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1995. V. 12. P. 971–991.
25. Cordes M.H.J., Davidson A.R., Sauer R.T. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1996. V. 6. P. 3–10.
26. West M.V., Hecht M.H. // *Protein Sci.* 1995. V. 4. P. 2032–2039.
27. Seale J.V., Srinivasan R., Rose G.D. // *Protein Sci.* 1994. V. 3. P. 1741–1745.
28. ElMasry N.F., Fersht A.R. // *Protein Eng.* 1994. V. 7. P. 777–782.
29. Serano L., Sancho J., Hirshberg M., Fersht A.R. // *J. Mol. Biol.* 1992. V. 227. P. 544–559.
30. Minoz V., Serrano L. // *Proteins*. 1994. V. 20. P. 301–311.
31. Park C.S., Miller C. // *Biochemistry*. 1992. V. 31. P. 7749–7755.
32. Goldstein S.A.N., Pheasant D.J., Miller C. // *Neuron*. 1994. V. 12. P. 1377–1388.
33. Stampe P., Kolmakova-Partensky L., Miller C. // *Biochemistry*. 1994. V. 33. P. 443–450.
34. Bernstein F.C., Koetzle T.F., Williams G.J.B., Meyer E.F., Jr., Brice M.D., Rodgers J.R., Kennard O., Shimanouchi T., Tasumi M. // *J. Mol. Biol.* 1977. V. 112. P. 535–542.
35. Efremov R.G., Gulyaev D.I., Vergoten G., Modyanov N.N. // *J. Protein Chem.* 1992. V. 11. P. 665–675.
36. Kikuchi T. // *J. Protein Chem.* 1992. V. 11. P. 305–320.
37. Viswanadhan V.N., Ghose A.K., Revankar G.R., Robins R.K. // *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 1989. V. 29. P. 163–172.
38. Волькенштейн М.В. Биофизика. М.: Наука, 1988. С. 565–566.
39. TRIPOS Associates Inc., SYBYL version 6.2: Molecular Modelling Software. 1995.
40. Koradi R. MOLMOL Manual. Institut für Molekularbiologie und Biophysik ETH-Henggerberg, CH-8093, Zürich.

The Rational Evolution of Scorpion Toxins

V. A. Jaravine, A. P. Golovanov, and A. S. Arseniev

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

Abstract—A theoretical method for the rational design of a “universal” scorpion toxin with a wider spectrum of specificity for K⁺ channels and a more stable α/β -folding than in its natural homologues is described. On the basis of the analysis of molecular hydrophobic potentials (MHP) of the protein spatial structures, structural features for a family of five short scorpion toxins were revealed. The analysis of the maps of two-dimensional intramolecular MHP contacts allowed the identification of amino acid residues responsible for the folding of the protein and/or for the manifestation of its specific function. The theoretically predicted structure–function roles of the residues were compared with experimental data on the mutagenesis of charybdotoxin. Based on the results of MHP calculations and with the theory of protein molecular evolution used as an additional criterion for the selection of mutations, the amino acid sequence and the spatial structure of a “universal” scorpion toxin were determined.

Key words: rational protein design, hydrophobic interactions, scorpion toxins.