



УДК 577.322.4:591.145-546:543.422.23

КОНФОРМАЦИОННЫЙ ЯМР-АНАЛИЗ
ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ИНСЕКТОТОКСИНА*I₅A Buthus eurus*Арсеньев А. С., Кондаков В. И., Майоров В. Н.,
Быстров В. Ф., Овчинников Ю. А.Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Методами ¹H-ЯМР-спектроскопии определены параметры, характеризующие пространственную структуру инсектотоксина I₅A: *Buthus eurus*: pH-зависимость химических сдвигов сигналов, скорость дейтерообмена протонов NH-групп с растворителем, константы спин-спинового взаимодействия между протонами H-N-C^α-H и H-C^α-C^β-H, ядерные эффекты Оверхаузера между протонами удаленных по полипептидной цепи остатков аминокислот. Установлена конформация участков Asp⁹-Cys¹⁹ (комбинация β-изгиба 9–12 и правой α-спирали 12–19) и Asn²³-Asn³⁴ (антипараллельная β-структура с β-изгибом 27–30). С помощью дистанционного геометрического алгоритма в псевдоатомном приближении определена полная пространственная структура молекулы и предложен наиболее вероятный способ замыкания дисульфидных связей (Cys²-Cys¹⁹, Cys⁵-Cys³¹, Cys¹⁶-Cys²⁶ и Cys²⁰-Cys³³). Пространственная структура инсектотоксина I₅A *B. eurus*, характерными чертами которой является комбинация правой α-спирали (остатки 12–19) и антипараллельной β-структуры (остатки 23–34), имеет значительное сходство с пространственной структурой «длинного» токсина V-3 скорпиона *Centruroides sculpturatus*.

Инсектотоксин I₅A, выделенный из яда кавказского скорпиона *Buthus eurus*, принадлежит к гомологичной группе «коротких» инсектотоксинов скорпионов ($M \approx 4000$ Да), специфически действующих на нервную систему насекомых [1]. Инсектотоксин I₅A состоит из 35 L-аминокислотных остатков:

Met-Cys-Met-Pro-Cys-Phe-Thr-Thr-Asp-Pro-Asn-Met-Ala-Lys-Lys-Cys-Arg-Asp-Cys-Cys-Gly-Gly-Asn-Gly-Lys-Cys-Phe-Gly-Pro-Gln-Cys-Leu-Cys-Asn-Arg-NH₂ [2]. Локализация дисульфидных связей неизвестна.

Настоящая работа развивает начатые ранее исследования, в ходе которых методами двумерной ¹H-ЯМР-спектроскопии была уточнена аминокислотная последовательность инсектотоксина I₅A, проведено полное отнесение сигналов в спектрах ¹H-ЯМР к определенным протонам в ковалентной структуре молекулы, установлена конфигурация X-Про-пептидных связей и охарактеризована вторичная структура [2]. Теперь основное внимание уделено получению детальной информации о пространственной структуре инсектотоксина I₅A в водном растворе — определены NH-группы, участвующие во внутримолекулярных водородных связях, измерены константы спин-спинового взаимодействия между протонами H-N-C^α-H и H-C^α-C^β-H, характеризующие соответственно торсионные углы φ и χ', выявлена пространственная сближенность протонов в остатках, удаленных по аминокислотной последовательности, найдены значения pK_a ионизируемых групп и прослежено их влияние на химические сдвиги сигналов протонов молекулы. Анализ этих данных позволил предложить модель трехмерной структуры инсектотоксина I₅A *B. eurus* в растворе.

pH-Зависимость химических сдвигов сигналов в ¹H-ЯМР-спектрах

Молекула инсектотоксина содержит шесть ионизируемых групп, способных изменять зарядовое состояние в исследованном диапазоне значений

Сокращения: KCCB — константа спин-спинового взаимодействия, ЯЭО — ядерный эффект Оверхаузера, NOESY — двумерная спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера, COSY — двумерная корреляционная спектроскопия.

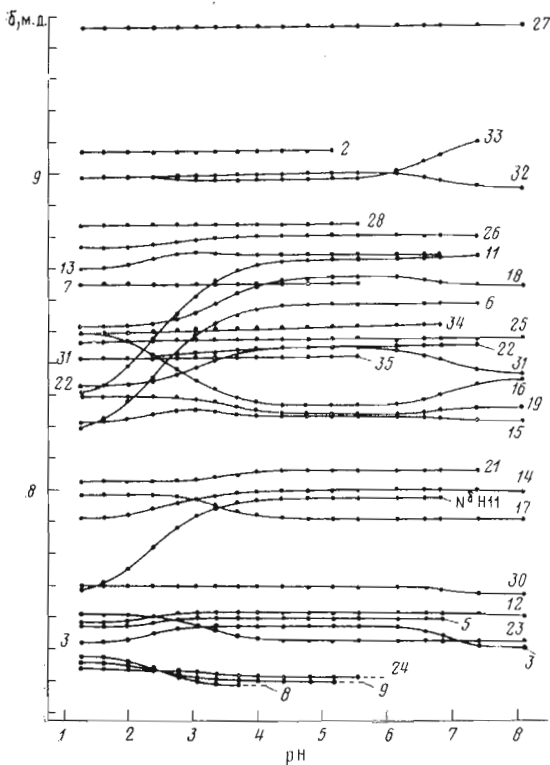


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость химических сдвигов сигналов от амидных протонов остатков инсектотоксина I₅A в спектрах ¹H-ЯМР (500 МГц) от pH раствора в H₂O (10% ²H₂O) при 32°С. Цифрами обозначены номера остатков в аминокислотной последовательности. Отнесение сигналов к определенным остаткам выполнено в работе [2]

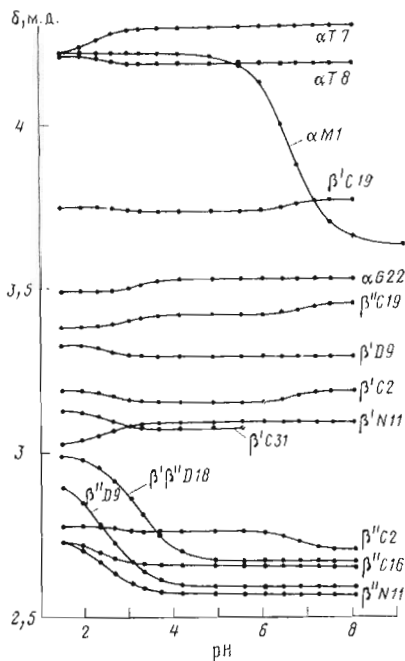


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость химических сдвигов сигналов от протонов C^αH и C^βH в спектрах ¹H-ЯМР инсектотоксина I₅A от pH раствора в ²H₂O при 32°С. Буквы α и β означают принадлежность сигнала протону C^αH или C^βH соответственно. Здесь и далее буквы и цифры указывают в однобуквенном коде отнесение сигнала к соответствующему остатку в аминокислотной последовательности

pH от 1 до 12: две β-карбоксыльные группы (остатки Asp^{9, 18}), α-аминогруппу N-концевого остатка (Met¹) и три ε-аминогруппы (остатки Lys^{14, 15, 25}). Стандартные значения pK_a, измеренные для модельных пептидов с неупорядоченной структурой, равны: 3,9±0,1 для β-карбоксыльной группы аспарагиновой кислоты [3], 11,1±0,2 для ε-аминогруппы лизина [3] и 8,0 для α-аминогруппы [4]. Зависимость химических сдвигов амидных протонов от pH раствора исследована в диапазоне значений pH от 1,23 до 8,12 (рис. 1). При более высоких значениях pH возрастает скорость протонного обмена между NH-группами и растворителем (H₂O), что приводит к уширению сигналов протонов NH-групп. На рис. 1 показана pH-зависимость химических сдвигов 30 амидных протонов основной цепи и одного протона N^oH боковой цепи остатка Asn¹¹. Химические сдвиги сигналов амидных протонов NH₂-групп боковых цепей остальных остатков Asn^{23, 34}, Gln³⁰ и C-концевой амидной группы практически постоянны в исследованном диапазоне pH и на рис. 1 не показаны. Из-за перекрытия с сигналами от ароматических протонов остатков Phe^{6, 27} сигналы от амидных протонов остатков Thr⁸, Asp⁹ и Gly²⁴ прослежены в сравнительно узком интервале значений pH, а сигнал протона NH-группы остатка Cys²⁰ удалось выделить только при pH 1,50 в интервале температур от 50 до 60°С.

На рис. 2 показана pH-зависимость химических сдвигов сигналов алифатических протонов СН-групп, которые наиболее чувствительны к изме-

Параметры, определяющие зависимость химических сдвигов сигналов амидных протонов от pH (H_2O , $32^\circ C$), и время полуобмена, $t_{1/2}$, амидных протонов на дейтерий растворителя 2H_2O , pH 2,7 и 5,1, $22^\circ C$

Остаток	δ_{H^+}	$\Delta\delta_1$	pK_a^1	h_1	$\Delta\delta_2$ м.д.	pK_a^2	h_2	$t_{1/2}$, ч	
	м.д.							pH 2,7	pH 5,1
Met ¹ *	7,80							<0,2	
Cys ²	9,06							<0,2	
Met ³	7,52	-0,05	~2,5		0,11	6,93±0,05	0,94	4,1	
Cys ³	7,57	-0,03	~2,5					46	26
Phe ⁵	8,19	-0,40	2,54±0,02	0,91				0,9	
Thr ⁷	8,65							<0,2	
Thr ⁸	7,48	0,08	~2,5					0,6	
Asp ⁹	7,46	0,04	~2,5					2,3	
Asn ¹¹	8,31	-0,46	2,51±0,03	0,87				<0,2	
¹⁵ N Asn ¹¹	7,68	-0,30	2,44±0,02	1,00				<0,2	
Met ¹²	7,58	-0,04	~2,5					42	1,3
Ala ¹³	8,70	-0,05	~2,5					1,1	
Lys ¹⁴	7,91	-0,10	2,57±0,06	0,85				7,9	
Lys ¹⁵	8,21	-0,04	~2,5		0,02	~3,5		>100	8,3
Cys ¹⁶	8,49	0,27	2,77±0,02	0,76	-0,10	6,92±0,05	1,1	>100	5,2
Arg ¹⁷	7,98	0,08	3,50±0,05	0,97				>100	29
Asp ¹⁸	8,52	-0,15	3,42±0,07	1,02	0,03	~6,9		78	16
Cys ¹⁹	8,29	0,05	~3,3		-0,02	~6,9		>100	9,2
Gly ²¹	8,03	-0,04	~3,3					5,6	
Gly ²²	8,33	-0,13	3,12±0,08	0,82				5,8	
Asn ²³	7,61	0,09	~3,3					0,3	
Gly ²⁴	7,44	0,02	~3,3					3,0	
Lys ²⁵	8,46							>100	72
Cys ²⁶	8,77	-0,03	~2,5					16,8	
Phe ²⁷	9,45							>100	13
Gly ²⁸	8,84							0,5	
Gln ³⁰	7,70	0,03	~6,9					>100	31
Cys ³¹	8,42	-0,03	~2,5		0,10	6,98±0,06	0,89	>100	7,1
Leu ³²	8,98	0,05	~6,9					>100	100
Cys ³³	8,98	0,02	~2,5		-0,15	6,88±0,07	1,02	2,2	
Asn ³⁴	8,49							2,4	
Arg ³⁵	8,42							0,3	

*Химический сдвиг сигнала протонов NH_3^+ -группы остатка Met¹ измерен при $25^\circ C$ и pH 2,9. Положительное значение $\Delta\delta$ означает сдвиг сигнала в слабое поле при понижении pH.

нению pH раствора в диапазоне от pH 1,56 до 8,25. Смещение остальных сигналов от алифатических протонов при этом не превышает 0,02 м.д., т. е. не намного отличается от погрешности измерения химического сдвига.

В диапазоне значений pH от 8,0 до 8,8 химические сдвиги всех сигналов (кроме $C^\alpha H$ Met¹) постоянны. При значениях $pH \geq 8,8$ начинается титрование ϵ -аминогруппы трех остатков лизина, сопровождаемое падением растворимости инсектотоксина. Поэтому при значениях $pH \geq 8,8$ и до предельно использованного в эксперименте значения pH 11,8 химические сдвиги прослежены только для неперекрываемых сигналов и сигналов протонов $C^\alpha H_2$ -групп остатков Lys^{14, 15, 25}.

В табл. 1 и 2 приведены результаты анализа pH-зависимостей химических сдвигов сигналов амидных и алифатических протонов (см. «Экспериментальную часть»). В соответствии с числом ионогенных групп в молекуле инсектотоксина были найдены шесть значений pK_a . Химические сдвиги протонов аминокислотных остатков, содержащих ионогенные группы, испытывают изменение ионизационного состояния только одной, собственной ионогенной группы (рис. 1 и 2, табл. 1 и 2), поэтому отнесение значений pK_a не вызвало затруднений: pK_a 2,5 соответствует β -карбок-сильной группе Asp⁹, 3,2 — β -карбок-сильной группе Asp¹⁸, 6,9 — α -амино-

Параметры, определяющие зависимость химических сдвигов сигналов алифатических протонов от pH
 $^2\text{H}_2\text{O}$, 32° С

Остаток	Протон при атоме углерода	δH^+		$\Delta\delta_1$	ρK_a^1	h_1	$\Delta\delta_2$, м.д.	ρK_a^2	h_2
Met ¹	C $^\alpha$	4,23	0,61		6,95±0,04	1,02			
Cys ²	C $^{\beta'}$	3,19	0,04		~2,5		-0,03	~6,9	
	C $^{\beta''}$	2,77	0,02		~2,5		0,06	~6,9	
Thr ⁷	C $^\alpha$	4,22	-0,06		~2,5				
Thr ⁸	C $^\alpha$	4,21	0,03		~2,5				
Asp ⁹	C $^{\beta'}$	3,34	0,04		~2,5				
	C $^{\beta''}$	2,92	0,32		2,51±0,05	0,95			
Asn ¹¹	C $^\alpha$	4,98	-0,21		2,57±0,04	1,2	0,22	11,04±0,04	1,1
	C $^{\beta'}$	3,03	-0,06		~2,5				
	C $^{\beta''}$	2,73	0,17		2,46±0,04	1,1	-0,14	11,00±0,05	1,0
Lys ¹⁴	C $^\epsilon$	2,96	0,30		11,1±0,05	0,99			
Lys ¹⁵	C $^\epsilon$	3,01	0,35		10,91±0,05	0,97			
Cys ¹⁶	C $^{\beta''}$	2,72	0,08		2,47				
Asp ¹⁸	C $^{\beta'}$, C $^{\beta''}$	2,99	0,33		3,23±0,05	0,94			
Cys ¹⁹	C $^{\beta'}$	3,77	0,02		~3,2		-0,03	~6,9	
	C $^{\beta''}$	3,34	-0,03		~3,2		-0,02	~6,9	
Gly ²²	C $^\alpha$	3,48	-0,03		~3,2				
Lys ²⁵	C $^\epsilon$	2,74	0,37		10,41±0,05	0,98			
Cys ³¹	C $^{\beta'}$	3,13	0,06		~2,5				

группе Met¹, 11,1 — ϵ -аминогруппе Lys¹⁴, 10,9 — ϵ -аминогруппе Lys¹⁵ и 10,4 — ϵ -аминогруппе Lys²⁵.

В исследованном диапазоне значений pH мы не наблюдали изменений констант спин-спинового взаимодействия протонов H-N-C $^\alpha$ -H. Это позволяет сделать вывод о сохранении конформации основной цепи инсектотоксина I₅A при изменении состояния ионогенных групп. Следовательно, влияние заряда этих групп на химические сдвиги протонов удаленных по аминокислотной последовательности остатков можно было бы объяснить их пространственной сближенностью. Однако величина электростатического эффекта зависит не только от расстояния, но и от угла между направлением химической связи и вектором, соединяющим атом водорода с центром ионогенной группы [5]. Кроме того, изменение заряда ионогенной группы может приводить к изменению ориентации боковых цепей других остатков и этот эффект может передаваться на большее расстояние. Поэтому данные о pH-зависимости химических сдвигов сигналов в спектрах ЯМР следует воспринимать как вспомогательные и с осторожностью использовать их при анализе пространственной структуры молекулы.

Скорость дейтерообмена амидных протонов. Дейтерообмен был проведен для 3 мМ раствора инсектотоксина I₅A в $^2\text{H}_2\text{O}$ при 22° С и двух значениях pH — 2,7 и 5,1. На рис. 3 показана зависимость от времени интенсивности сигналов NH при pH 2,7. За дейтерообменом следили в течение 46 ч при значениях pH 2,7, затем раствор был доведен до значения pH 5,1 и спектры снимали еще в течение 23 ч. В табл. 1 приведены времена полуобмена $t_{1/2}$ амидных протонов. Для некоторых амидных протонов указано время полуобмена <0,2 ч. Это означает, что через 0,2 ч, необходимых для приготовления образца, настройки спектрометра и съемки первого спектра, сигнал от соответствующего протона NH отсутствовал в спектре. Из данных табл. 1 видно, что для 12 NH-групп время полуобмена измеряется десятками часов. Очевидно, что соответствующие NH-группы участвуют в сильных внутримолекулярных водородных связях или пространственно экранированы соседними группировками от контактов со средой. Примечательно, что указанные NH-группы в основном принадлежат ами-

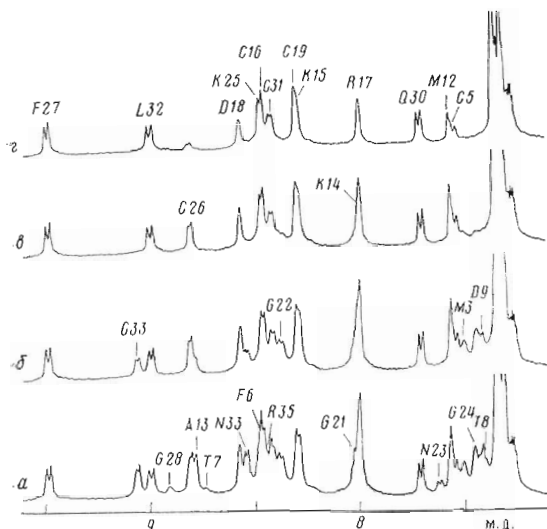


Рис. 3. Слабополярная область спектра ^1H -ЯМР инсектотоксина I_5A через 0,3 (а), 1,8 (б), 8,5 (в) и 45,5 ч (г) после растворения в $^2\text{H}_2\text{O}$ при pH 2,7 (22°C). Время накопления одного спектра составляло 4 мин

нокислотным остаткам, расположенным, согласно предварительному анализу данных ЯМР [2], на участках регулярной структуры: α -спирали (фрагмент $\text{Asn}^{11}\text{—Gly}^{21}$) и антипараллельной β -структуры (фрагмент $\text{Asn}^{22}\text{—Asn}^{34}$).

Константы спин-спинового взаимодействия. Константы для вицинальных протонов $\text{H—N—C}^\alpha\text{—H}$ и $\text{H—C}^\alpha\text{—C}^\beta\text{—H}$ дают детальную информацию о торсионных углах φ и χ^1 индивидуальных аминокислотных остатков в пептидах и белках [6]. В табл. 3 приведены КССВ протонов $\text{H—N—C}^\alpha\text{—H}$ ($^3J_{\text{H—N—C}^\alpha\text{—H}}$), определенные из одномерных ^1H -ЯМР-спектров раствора инсектотоксина в H_2O и $^2\text{H}_2\text{O}$ по расщеплению сигналов протонов NH с поправкой на полуширину [6].

Для остатков глицина, которые содержат два протона C^αH , наблюдаются соответственно две КССВ $\text{H—N—C}^\alpha\text{—H}$. Отнесение этих констант к определенному протону C^αH глицинового остатка выполнено с помощью гомоядерного двойного резонанса. Мы не наблюдали изменений значений $^3J_{\text{H—N—C}^\alpha\text{—H}}$ во всем диапазоне экспериментальных условий: изменении pH от 1,23 до 8,12 при 32°C и изменении температуры от 10 до 60°C при значениях pH 1,5; 2,7 и 4,7.

Сигналы от протонов C^αH и C^βH расположены, за редким исключением, в перекрытых областях ^1H -ЯМР-спектров пептидов. Это затрудняет измерение КССВ протонов $\text{H—C}^\alpha\text{—C}^\beta\text{—H}$ в одномерных ^1H -ЯМР-спектрах. Поэтому мы использовали двумерные J -спектры ^1H -ЯМР. На рис. 4 показан фрагмент двумерного J -спектра инсектотоксина в растворе $^2\text{H}_2\text{O}$ с полностью обмененными на дейтерий амидными NH -группами. Наиболее удобно для измерений КССВ использовать поперечные сечения вдоль оси J . В качестве примера на рис. 5 показаны сечения по химическим сдвигам протонов C^αH и C^βH остатков Cys^5 и Asn^{11} . Такие спектры позволяют не только измерить КССВ $^3J_{\text{H}^\alpha\text{—H}^\beta}$ и $^2J_{\text{H}'\text{—H}^\alpha}$, но и провести отнесение константы к протону C^βH , имеющему определенный химический сдвиг. В табл. 3 приведены КССВ алифатических протонов, измеренные в J -спектрах по расщеплению сигналов, с учетом поправки на полуширину сигнала [7]. В большинстве случаев КССВ соотносятся с химическими сдвигами β -протонов.

Структурная интерпретация КССВ принципиально зависит от степени внутренней подвижности молекулы. Для конформационно подвижных коротких пептидов, не имеющих упорядоченной структуры, используют за-

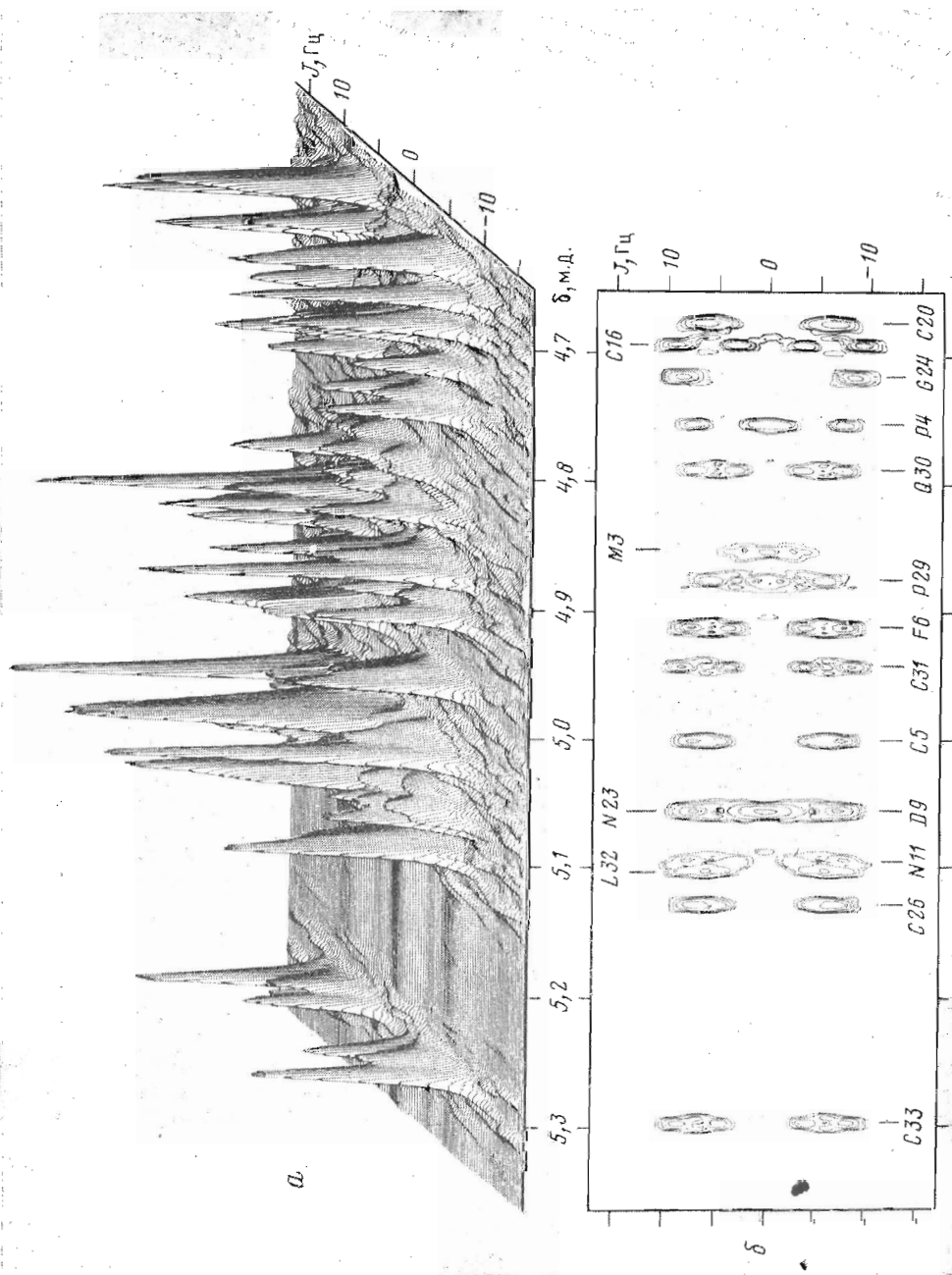
Константы спин-спинового взаимодействия (Гц) протонов инсектотоксина I₅A. Для КССВ протонов Н-Н-С^α-Н приведены средние значения при рН 1,5, 2,9 и 4,7 в интервале температур от 10 до 60° С. для КССВ алифатических протонов приведены средние значения, измеренные при рН 2,9 и 5,5 и температурах 30 и 50° С. В исследованных интервалах значений рН и температуры отклонение КССВ от приведенных в таблице не превышало ±0,3 Гц.

Остаток	Н-Н-С ^α -Н	Н-С ^α -Сβ'-Н	Н-С ^α -Сβ''-Н	Другие КССВ	
Met ¹		4,6	4,6		
Cys ²	6,6	4,3	10,5	β'β''	14,6
Met ³	4,7	3,5	3,5		
Pro ⁴		6,3	8,5		
Cys ⁵	9,5	12,2	2,7	β'β''	14,5
Pho ⁶	9,5	3,6	11,4	β'β''	14,1
Thr ⁷	5,0	3,5		βγ	6,6
Thr ⁸	7,6	2,0		βγ	6,8
Asp ⁹	8,0	12,2	3,6	β'β''	16,8
Pro ¹⁰		8,7	4,9		
Asn ¹¹	8,6	3,9	11,4	β'β''	15,1
Met ¹²	2,4 ^{1*}	4,2	11,7		
Ala ¹³	3,7	7,4			
Lys ¹⁴	5,0	4*			
Lys ¹⁵	4,2	11,0	3,2		
Cys ¹⁶	5,2 ^{2*}	5,8	12,3	β'β''	13,8
Arg ¹⁷	4,1	6,3	8,3		
Asp ¹⁸	3,9	11,6	3,1	β'β''	16,8
Cys ¹⁹	3,0	3,7	11,5	β'β''	14,3
Cys ²⁰	6,8 ^{3*}	2,0	12,6	β'β''	15,0
Gly ²¹	6,0; 6,0			α'α''	16,7
Gly ²²	9,9; 3,2			α'α''	17,2
Asn ²³	9,2	8,1	6,2	β'β''	16,0
Gly ²⁴	3,0			α'α''	17,2
Lys ²⁵	8,0	4*			
Cys ²⁶	7,0	2,5	12,5	β'β''	14,7
Phe ²⁷	10,0	3,9	10,6	β'β''	13,8
Gly ²⁸	4,2; 7,1			α'α''	14,8
Pro ²⁹		4*			
Gln ³⁰	9,6	10,7	3,8		
Cys ³¹	8,0	12,0	4,9	β'β''	13,8
Leu ³²	10,1	11,8	3,4	γδ	6,7
Cys ³³	7,8	3,9	12,7	β'β''	13,5
Asn ³⁴	7,2	6,3	8,2	β'β''	15,6
Arg ³⁵	7,8	4,8	9,9		

^{1*} Измерена при 55° С, рН 1,50. ^{2*} Измерена при 45° С, рН 4,7. ^{3*} Измерена при 55° С, рН 1,5. ^{4*} Химические сдвиги сигналов двух β-протонов близки.

зисимость КССВ ${}^3J_{\text{H}^\alpha\text{-H}^\beta}$ от населенностей вращательных состояний связи С^α-С^β [6]. Напротив, в случае конформационно жестких молекул используются зависимость КССВ ${}^3J_{\text{H}^\alpha\text{-H}^\beta}$ от торсионного угла χ^1 [6-11]. Недавно на примере основного панкреатического ингибитора трипсина [7, 9] и лизоцима из белка куриных яиц [11] показано, что для большинства аминокислотных остатков наблюдается хорошее (в пределах значения угла $\pm 30^\circ$) соответствие между КССВ ${}^3J_{\text{H}^\alpha\text{-H}^\beta}$, экспериментально измеренными в спектрах ¹H-ЯМР и вычисленными исходя из углов χ^1 , определенных методом рентгеноструктурного анализа. В работе [9] для аминокислотных остатков, имеющих два β-протона, был предложен метод распознавания двух предельных динамических ситуаций (конформационно подвижной и конформационно жесткой), основанной на взаимном соответствии двух КССВ ${}^3J_{\text{H}^\alpha\text{-H}^\beta'}$ и ${}^3J_{\text{H}^\alpha\text{-H}^\beta''}$. На рис. 6 показана корреляционная диаграмма КССВ ${}^3J_{\text{H}^\alpha\text{-H}^\beta'}$ — ${}^3J_{\text{H}^\alpha\text{-H}^\beta''}$, на которую нанесены данные для аминокислотных остатков инсектотоксина I₅A. Теоретические кривые вычисле-

Рис. 4. Область δ 4,65–5,36 м. д. и J – 17–17 Гц димерного J -спектра ^1H -ЯМР раствора инсектотоксина I_5A в $^2\text{H}_2\text{O}$ (рН 2,9; 50°C). а – трехмерное представление спектра, б – контурная карта



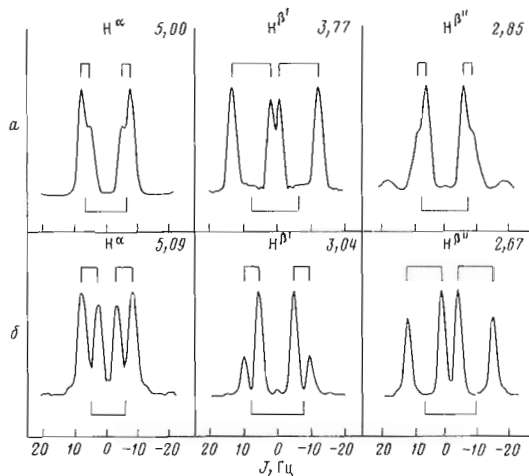


Рис. 5. Поперечные сечения вдоль оси J в J -спектре раствора инсектотоксина I_5A в 2H_2O (рН 2,9; $50^\circ C$). Показаны сигналы от протонов $C^\alpha H$ и $C^\beta H$ остатков Cys^2 (а) и Asn^{11} (б). В правых верхних углах сечений указаны химические сдвиги сигналов в м. д.

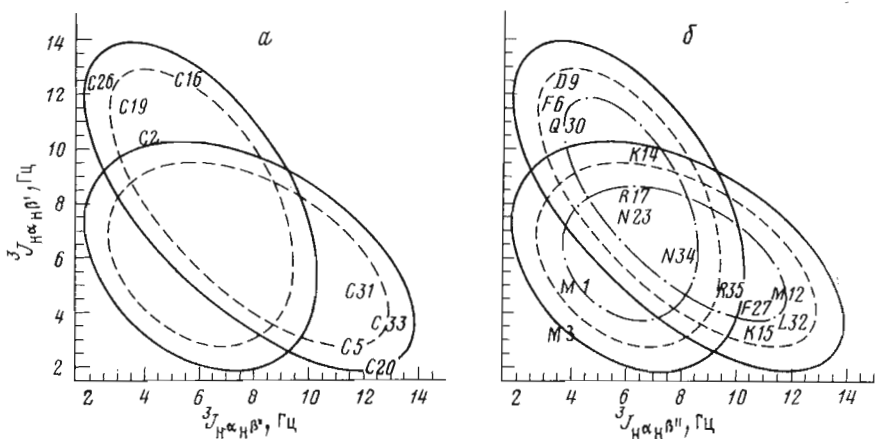


Рис. 6. Корреляционная диаграмма vicинальных КССВ $^3J_{H^\alpha-H^\beta'}$ и $^3J_{H^\alpha-H^\beta''}$ в аминокислотных остатках, построенная по угловой зависимости КССВ, полученной в работе [10]. Сплошная линия показывает взаимосвязь этих КССВ для жестких молекул с фиксированными значениями торсионного угла χ^1 . Штриховая и штрихпунктирная линии показывают корреляцию КССВ в предположении быстрого изменения угла χ^1 в диапазоне $\chi_0^1 \pm 30^\circ$ и $\chi_0^1 \pm 60^\circ$, соответственно. Указаны положения экспериментальных значений КССВ для аминокислотных остатков инсектотоксина I_5A : а — остатки цистеина, б — другие остатки

ны по уравнению, предложенному в работе [10]:

$$^3J_{H^\alpha-H^\beta} = 5,1 \cos 2\theta - 1,8 \cos \theta + 7,0,$$

где $\theta_{H^\alpha-H^\beta} = \theta_{H^\alpha-H^\beta'} - 120^\circ$.

Аналогично работе [9] экспериментально найденным точкам, расположенным в интервале между сплошной и штриховой линиями, соответствует ситуация, когда аминокислотный остаток имеет единственную предпочтительную ориентацию относительно связи $C^\alpha-C^\beta$ с быстрой, но ограниченной ($\pm 30^\circ$) флуктуацией угла χ^1 . Точки, не попадающие в этот интервал и лежащие на поверхности, ограниченной штриховой линией, указывают на быстрое усреднение между двумя или несколькими вращательными состояниями со значительно различающимися углами χ^1 . Если точка расположена вне площади, ограниченной сплошной линией, то наблюдаемые КССВ не согласуются с используемой зависимостью КССВ от угла χ^1 . Возможной

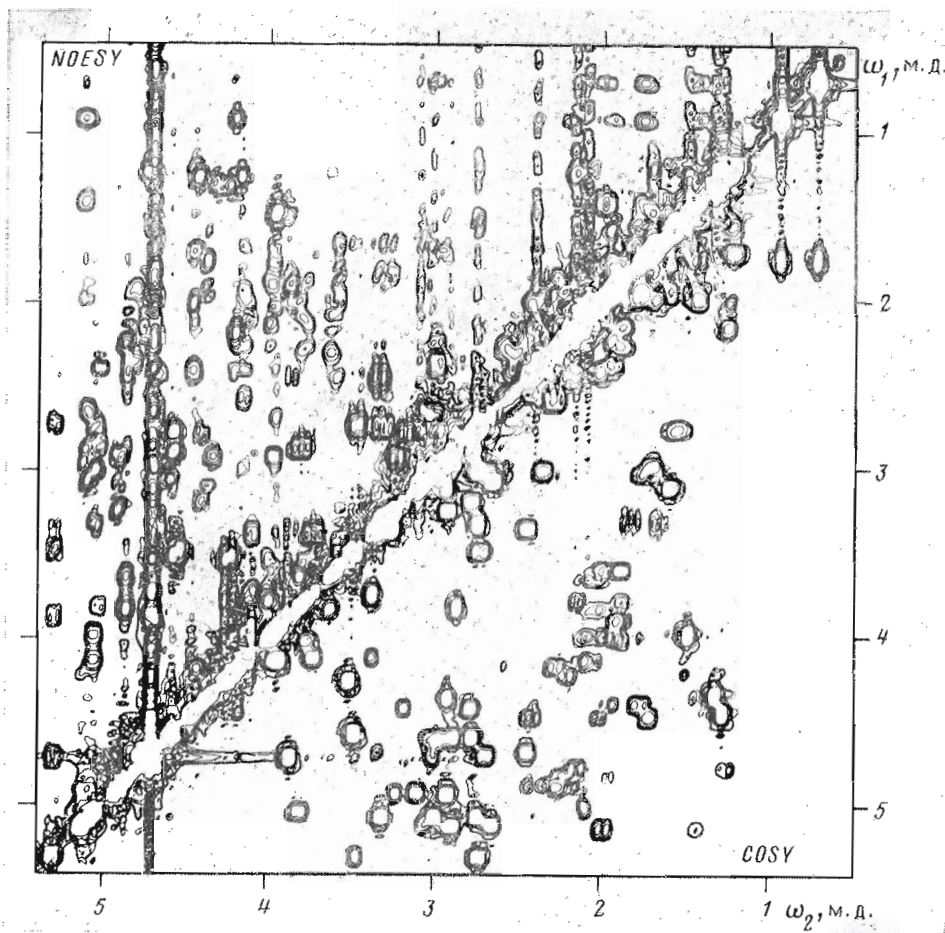


Рис. 7. Комбинированная диаграмма NOESY- и COSY-спектров ЯМР инсектотоксина I₃A в области ω_1 и ω_2 0,5–5,4 м.д. (²H₂O, pH 2,9; 30° С). Каждый спектр получен в течение 23 ч, цифровое разрешение 4,9 Гц, время смешивания компонентов намагниченности, t_m , 100 мс. В левом верхнем треугольнике показан спектр NOESY, а в правом нижнем треугольнике спектр COSY

причиной этого является стерическое напряжение в молекуле, приводящее к искажению валентных углов и отклонению КССВ от стандартных значений.

В инсектотоксине I₃A имеются два остатка треонина (-7 и -8), которые содержат только по одному протону C^βH, и, следовательно, для них нельзя использовать приведенный выше анализ. Однако значение $^3J_{H^{\alpha}-H^{\beta}} \leq 2$ Гц для Thr⁸ отвечает экстремально малому значению КССВ*. Поэтому Thr⁸ может иметь два предпочтительных значения угла χ^1 , которые отвечают *gauche*-ориентации протонов H^α-H^β. Значение $^3J_{H^{\alpha}-H^{\beta}}$ 3,6 Гц для остатка Thr⁷ не позволяет сделать однозначный вывод о вращательном состоянии боковой цепи.

Большинство КССВ протонов H^α-H^β измерены при температурах 30 и 50° С и значениях pH 2,9 и 5,5 (табл. 3). При этом не обнаружено каких-либо изменений в КССВ $^3J_{H^{\alpha}-H^{\beta}}$ (так же как и в $^3J_{H-N-C^{\alpha}-H}$). Следовательно, конформация молекулы инсектотоксина практически не зависит от температуры и pH.

Ядерный эффект Оверхаузера. NOESY-спектры содержат большое число кросс-пигов — проявления ЯЭО между пространственно сближен-

* Для остатка треонина теоретическое значение $^3J_{H^{\alpha}-H^{\beta}}$, вычисленное по уравнению (1), необходимо разделить на 1,11 [10] для учета эффекта электроотрицательности OH-группы при β-углеродном атоме и согласования с экспериментальными значениями табл. 3.

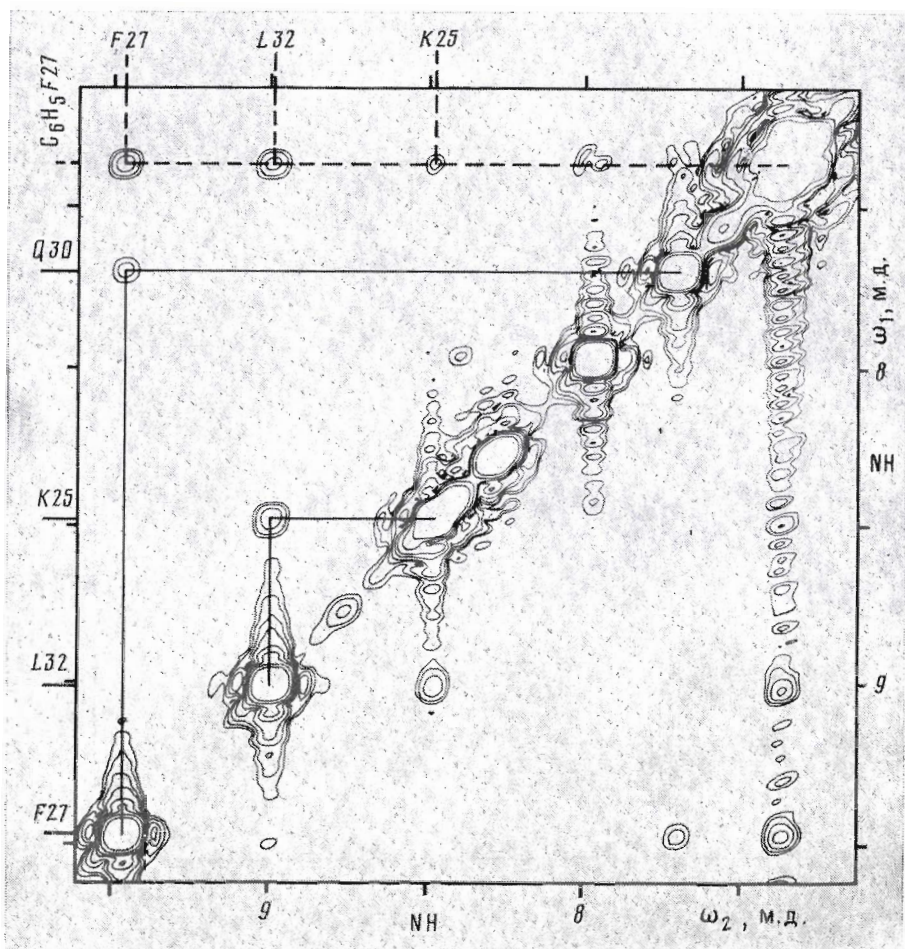


Рис. 8. Область ω_1 и ω_2 7,1–9,6 м.д. NOESY-спектра инсектотоксина I₅A в $^2\text{H}_2\text{O}$ (рН 2,9; 30° С), τ_m 100 мс. Спектр снят через 1 сут после растворения образца в $^2\text{H}_2\text{O}$, время накопления спектра 23 ч, цифровое разрешение 4,9 Гц. Сплошными прямыми линиями показаны связи кросс-пиков ЯЭО с диагональными сигналами для протонов NH, удаленных по аминокислотной последовательности остатков Leu³² и Lys²⁵, Gln³⁰ и Phe²⁷. Штриховые прямые линии отвечают кросс-пикам ЯЭО между ароматическими протонами остатка Phe²⁷ и протонами NH остатков Phe²⁷, Leu³² и Lys²⁵. Отнесения диагональных сигналов здесь и на рис. 9–12 указаны на полях диаграммы

ными протонами молекулы [12]. В это число входят тривиальные с точки зрения конформационного анализа пептидов ЯЭО между вицинальными и геминальными протонами аминокислотных остатков. Скалярные спин-спиновые взаимодействия между вицинальными и геминальными протонами проявляются в COSY-спектрах [13]. Поэтому в NOESY-спектрах ЯЭО этого типа легко выделить и исключить из дальнейшего рассмотрения путем сравнения NOESY- и COSY-спектров. В качестве примера на рис. 7 показана комбинированная диаграмма алифатических областей COSY- и NOESY-спектров инсектотоксина. Если кросс-пик присутствует в COSY- и NOESY-спектрах, то он соответствует взаимодействию между вицинальными или геминальными протонами. Нетривиальные ЯЭО наблюдаются между протонами соседних по аминокислотной последовательности остатков. ЯЭО этого типа, подробно описанные в предыдущей работе [2], использованы нами для последовательного отнесения сигналов в спектрах и для характеристики вторичной структуры инсектотоксина. Наиболее ценную информацию об укладке основной цепи полипептида дают ЯЭО между протонами удаленных по аминокислотной последовательности остатков.

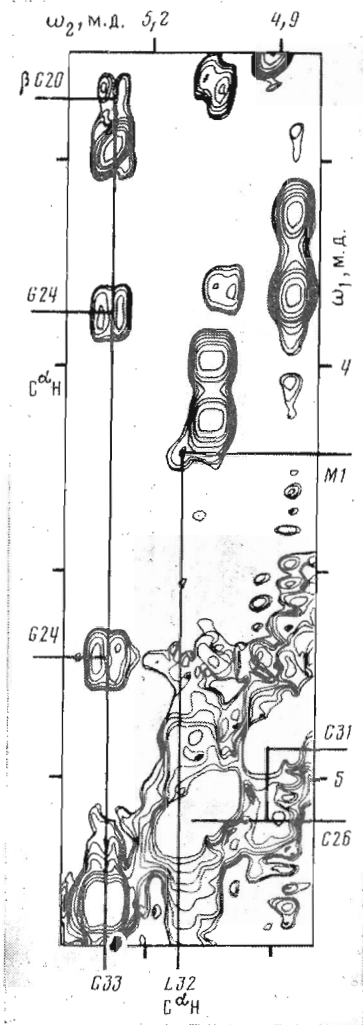


Рис. 9

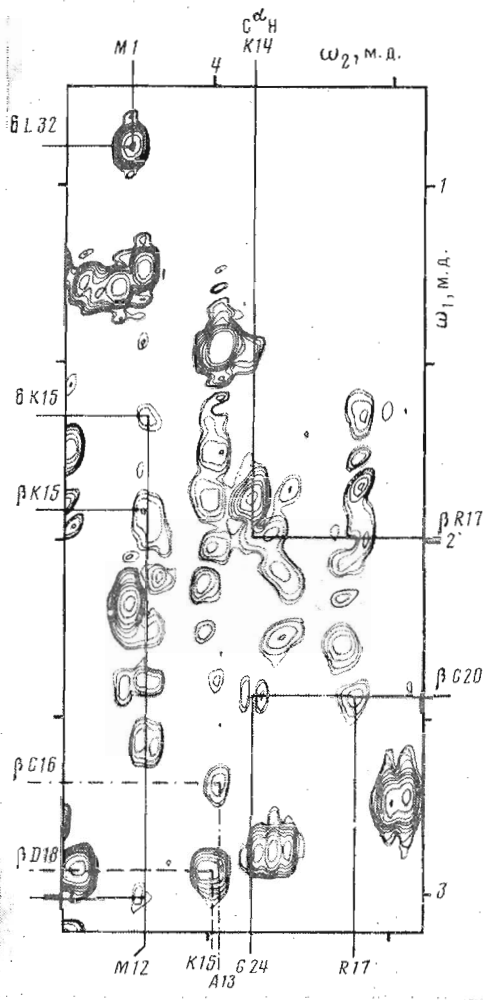


Рис. 10

Рис. 9. Область ω_1 3,25–5,40 м.д. и ω_2 4,85–5,35 м.д. NOESY-спектра (фрагмент спектра, показанного на рис. 7). Прямые линии выделяют кросс-пики ЯЭО между следующими протонами удаленных по аминокислотной последовательности остатков: между протонами $C^\alpha H$ остатков Cys²⁶ и Cys³¹, Met¹ и Leu⁵², Gly²⁴ и Cys³³ и между протоном $C^\alpha H$ Cys³³ и протоном $C^\beta H$ Cys²⁰

Рис. 10. Область ω_1 0,7–3,1 м.д. и ω_2 3,4–4,4 м.д. NOESY-спектра (фрагмент спектра, представленного на рис. 7). Прямые линии выделяют кросс-пики ЯЭО между следующими протонами удаленных по аминокислотной последовательности остатков: $C^\alpha H$ Met¹ и $C^\delta H_3$ Leu³², $C^\alpha H$ Lys¹⁴ и $C^\beta H$ Arg¹⁷, $C^\alpha H$ Met¹² и $C^\beta H$, $C^\alpha H$ Lys¹⁵, $C^\beta H$ Cys²⁰ и $C^\alpha H$ Gly²⁴, $C^\beta H$ Cys²⁰ и $C^\alpha H$ Arg¹⁷. Пунктирной прямой линией отмечены кросс-пики ЯЭО между протоном $C^\alpha H$ Lys¹⁵ и протонами $C^\beta H$ Asp¹⁸. Штрихпунктирной прямой линией показаны кросс-пики ЯЭО между протоном $C^\alpha H$ Ala¹³ и протоном $C^\beta H$ Cys¹⁶

На рис. 8–12 приведены фрагменты NOESY-спектров растворов инсектотоксина в 2H_2O и H_2O и указано отнесение кросс-пиков ЯЭО между протонами остатков, удаленных по аминокислотной последовательности. В большинстве случаев, как, например, для ЯЭО между амидными протонами остатков Phe²⁷ и Gln³⁰ (рис. 8) или между протоном $C^\alpha H$ Cys³³, двумя протонами $C^\alpha H$ Gly²⁴ и протоном $C^\beta H$ Cys²⁰ (рис. 9), отнесение кросс-пиков в NOESY-спектрах не вызывало затруднений, поскольку для исследуемых протонов сигналы заметно отличаются от сигналов других протонов. Ниже обсуждаются более сложные случаи отнесения сигналов.

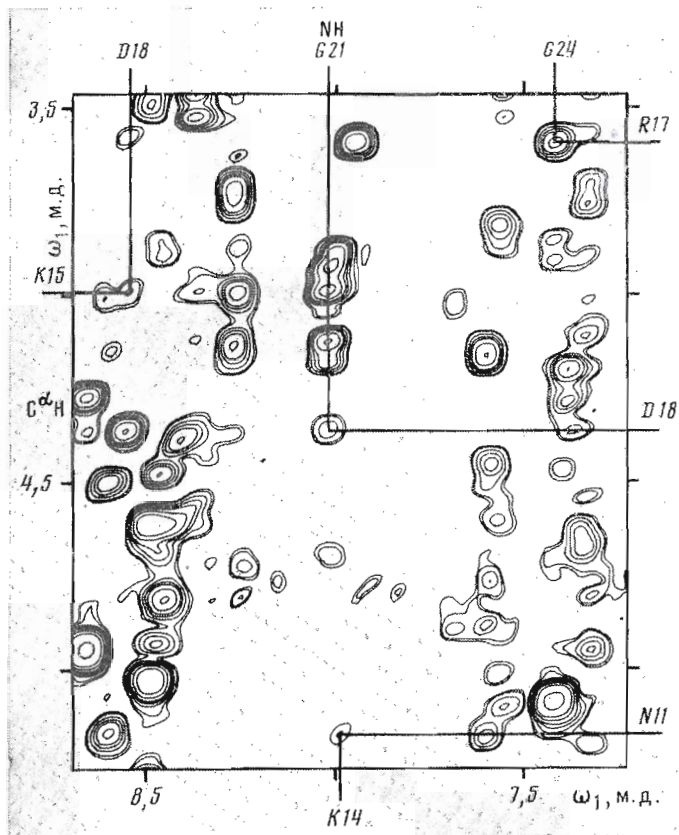


Рис. 11. Область ω_1 3,45–5,23 м.д. и ω_2 7,23–8,70 м.д. NOESY-спектра инсектотоксина I₅A в H₂O (10% ²H₂O, pH 2,9; 30° С). Остальные условия см. подпись к рис. 8. Сплошные линии указывают кросс-пики ЯЭО между следующими протонами удаленных по аминокислотной последовательности остатков: NH Asp¹⁸ и C^αH Lys¹⁵, NH Gly²¹ и C^αH Asp¹⁸, NH Gly²⁴ и C^αH Arg¹⁷, NH Lys¹⁴ и C^αH Asn¹¹

В NOESY-спектре на рис. 9 присутствует ЯЭО кросс-пик, расположенный при ω_1 4,23 м.д. и ω_2 5,15 м.д. Химический сдвиг 4,23 м.д. имеет только сигнал от протона C^αH остатка Met¹. Химический сдвиг 5,15 м.д. отвечает сигналам от протонов C^αH двух остатков — Asn¹¹ и Leu³². Поскольку уже имеется однозначно отнесенный ЯЭО между протонами C^δH₃ остатка Leu³² и протоном C^αH остатка Met¹ (рис. 10), то кросс-пик при ω_1 4,23 м.д. и ω_2 5,15 м.д. следует, по-видимому, отнести к ЯЭО между протонами C^αH остатков Met¹ и Leu³².

Рассмотрим отнесение кросс-пика ЯЭО при ω_1 2,33 м.д. и ω_2 8,46 м.д. (рис. 12). Химический сдвиг 8,46 м.д. имеют при 30° С сигналы от протонов NH остатков Phe⁶ и Lys²⁵, а химический сдвиг 2,33 м.д. — сигналы от протонов C^γH Met¹², C^βH Met³ и C^γH₂ Gln³⁰. Сигналы от протонов NH остатков Phe⁶ и Lys²⁵, однако, имеют различные химические сдвиги при 50° С, поэтому сравнением NOESY-спектров при 30° С (рис. 12) и 50° С указанный кросс-пик ЯЭО был отнесен к протону NH остатка Phe⁶. Для отнесения сигнала с химическим сдвигом 2,33 м.д., имеющего ЯЭО с NH-протоном остатка Phe⁶, использован эффект спиновой диффузии, проявляющийся в NOESY-спектрах при увеличении времени смешивания компонент намагниченности (τ_m). В данном случае при τ_m 500 мс (30° С) появляется дополнительный кросс-пик при ω_1 2,99 м.д. и ω_2 8,46 м.д., отвечающий ЯЭО между амидным протоном остатка Phe⁶ и вторым C^γ-протоном Met¹², тогда как соответствующие кросс-пики с протонами остатков Met³ или Gln³⁰ отсутствуют. Таким образом, рассматриваемый кросс-пик (рис. 12) следует приписать ЯЭО между NH-протоном остатка Phe⁶ и C^γH-протоном Met¹².

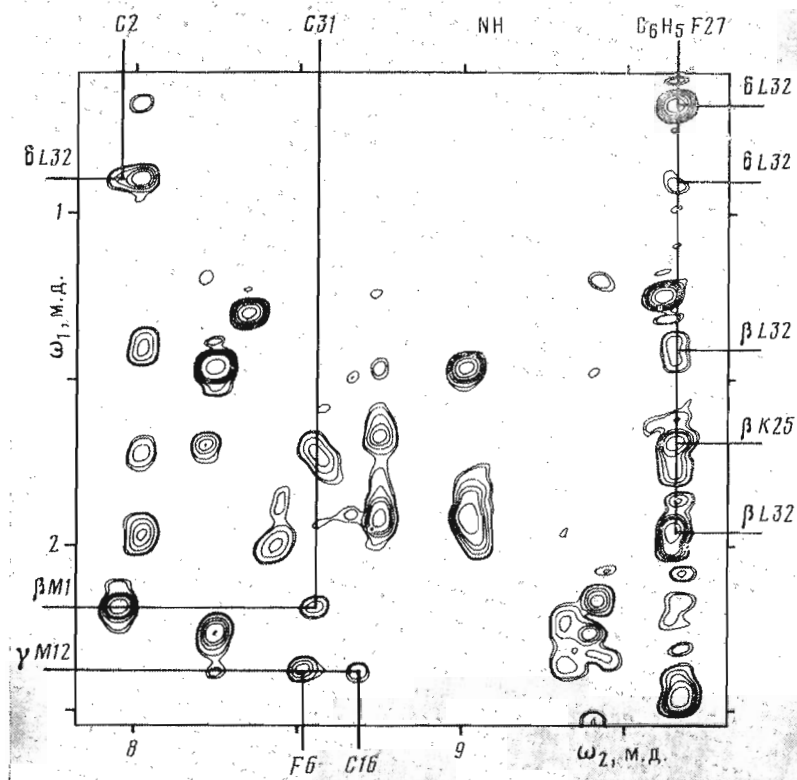


Рис. 12. Область ω_1 0,57–2,505 м.д. и ω_2 7,20–9,17 м.д. NOESY-спектра инсектотоксина I_5A в H_2O . (Остальные условия эксперимента см. подпись к рис. 8). Силочными линиями отмечены ЯЭО-пики между следующими протонами удаленных по аминокислотной последовательности остатков: NH Cys² и C⁶H₃ Leu³², NH Cys³¹ и C⁶H Met¹, NH Phe⁶ и C¹H Met¹², NH Cys¹⁶ и C¹E Met¹², ароматическими протонами Phe²⁷ и протонами C⁶H₂, C⁶H₃ Leu³² и C⁶H Lys²⁵.

Результаты отнесения ЯЭО между протонами остатков, удаленных по аминокислотной последовательности, приведены на рис. 13. Для нескольких кросс-пиков ЯЭО не удалось получить однозначное отнесение.

Кроме описанных выше приемов была предпринята попытка, оказавшаяся неудачной, отнесения кросс-пиков ЯЭО в NOESY-спектрах с помощью дистанционного геометрического алгоритма по методу, предложенному в работе [14]. Причиной неудачи является использование в настоящей работе слишком грубого псевдоатомного описания молекулы (см. ниже).

Пространственная структура инсектотоксина I_5A

При конструировании конформации молекулы инсектотоксина I_5A необходимо обеспечить выполнение следующих условий: 1) межатомные расстояния должны согласоваться с ЯЭО между протонами удаленных по аминокислотной последовательности остатков (рис. 13); 2) торсионные углы φ , ψ и χ^1 должны соответствовать КССВ ${}^3J_{H-N-C\alpha-H}$ (табл. 3), ${}^3J_{H-C\alpha-C\beta-H}$ (табл. 3) и ЯЭО-расстояниям d_1 , d_2 и d_3 между протонами соседних по аминокислотной последовательности остатков [2]; 3) медленно обменивающиеся с растворителем протоны NH-групп (табл. 1) должны участвовать в образовании внутримолекулярных водородных связей или быть экранированными от растворителя; 4) молекула инсектотоксина I_5A должна содержать четыре дисульфидные связи. Кроме этих обусловленных экспериментальными данными условий необходимо выполнение следующих априорных ограничений: молекула должна иметь плотную упаковку и находиться в энергетическом минимуме. Таким образом, пространственная

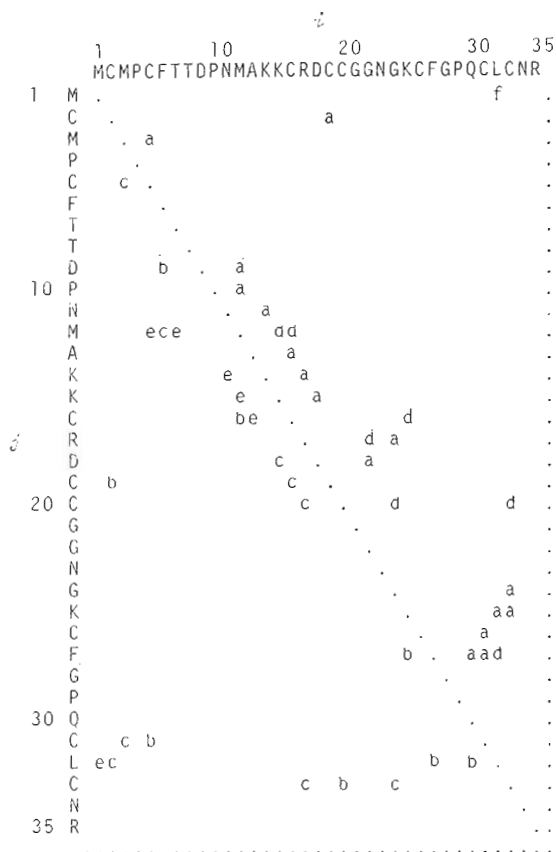


Рис. 13. Контакты между псевдоатомами удаленных по аминокислотной последовательности i -го и j -го остатков инсектотоксина I_3A , идентифицированные в NOESY-спектрах: a – контакт псевдоатомов $\alpha\alpha$, b – $\beta\beta$, c – $\alpha\beta$, d – $\beta\alpha$, e – $\beta\alpha$ и $\alpha\beta$, f – $\alpha\alpha$ и $\beta\alpha$. Каждый контакт указан сверху или внизу относительно диагонали

структура полипептида, даже такого короткого, как инсектотоксин, является сложной функцией большого числа экспериментальных и теоретических параметров. Поэтому очевидно, что полный конформационный ЯМР-анализ пептида может быть выполнен только с помощью ЭВМ, позволяющих манипулировать большим массивом данных.

Конформация фрагментов инсектотоксина I_3A . Основываясь на имеющихся экспериментальных данных, можно дать описание отдельных структурных фрагментов молекулы инсектотоксина I_3A в атомном приближении без использования ЭВМ.

Участок молекулы инсектотоксина I_3A от Asp⁹ до Cys¹⁹, показанный на рис. 14, представляет собой комбинацию β -изгиба (фрагмент 9–12) и правой α -спирали (фрагмент 12–19). Эта конформация удовлетворяет следующим экспериментальным данным: 1) протоны, сближенные до расстояния меньше 3,5 Å, дают кросс-пики ЯЭО в NOESY-спектрах (соответствующие контакты показаны на рис. 14 стрелками); 2) медленно обменивающиеся с растворителем амидные протоны NH (табл. 1) образуют внутримолекулярные водородные связи (обозначены на рис. 14 точками, соединяющими амидный протон и атом кислорода карбонильной группы); 3) углы φ соответствуют значениям КССВ ${}^3J_{H-N-C\alpha-H}$ (табл. 3, рис. 15), ориентация боковых цепей остатков (углы χ^1) соответствуют значениям КССВ ${}^3J_{H\alpha-NH\beta}$ (табл. 3) и данным о ЯЭО между пространственно сближенными протонами.

Исходя из аналогичных критериев, построена конформация участка молекулы инсектотоксина I_3A от остатка Asn²³ до Asn³⁴ показанная на

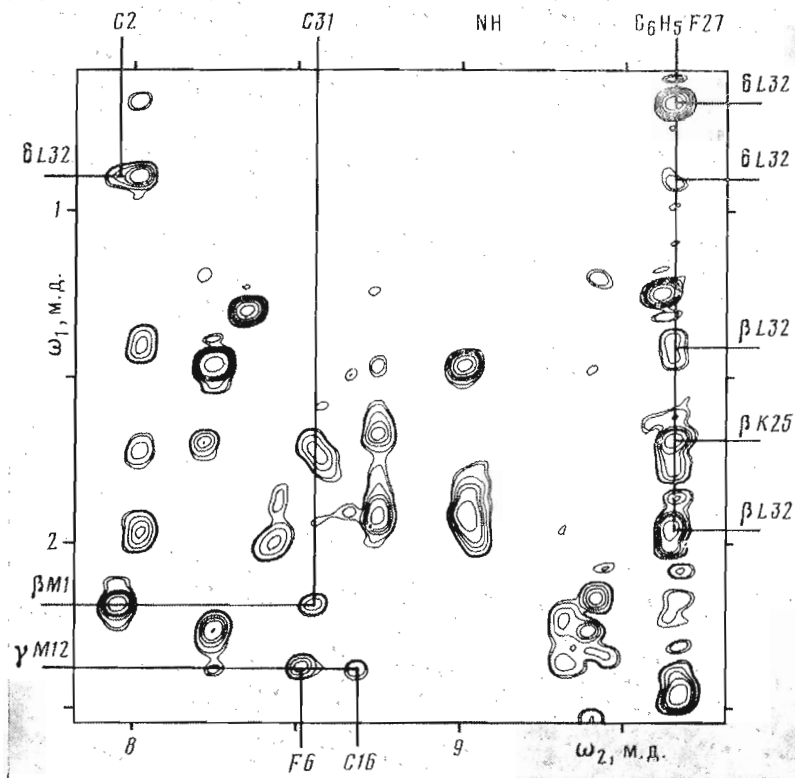


Рис. 12. Область ω_1 0,57–2,505 м.д. и ω_2 7,20–9,17 м.д. NOESY-спектра инсектотоксина I_5A в H_2O . (Остальные условия эксперимента см. подпись к рис. 8). Сплошными линиями отмечены ЯЭО-пики между следующими протонами удаленных по аминокислотной последовательности остатков: NH Cys² и C^βH₃ Leu³², NH Cys³¹ и C^βH Met¹, NH Phe⁶ и C^γH Met¹², NH Cys¹⁶ и C^γE Met¹², ароматическими протонами Phe²⁷ и протонами C^βH₂, C^βH₃ Leu³² и C^βH Lys²⁵.

Результаты отнесения ЯЭО между протонами остатков, удаленных по аминокислотной последовательности, приведены на рис. 13. Для нескольких кросс-пиков ЯЭО не удалось получить однозначное отнесение.

Кроме описанных выше приемов была предпринята попытка, оказавшаяся неудачной, отнесения кросс-пиков ЯЭО в NOESY-спектрах с помощью дистанционного геометрического алгоритма по методу, предложенному в работе [14]. Причиной неудачи является использование в настоящей работе слишком грубого псевдоатомного описания молекулы (см. ниже).

Пространственная структура инсектотоксина I_5A

При конструировании конформации молекулы инсектотоксина I_5A необходимо обеспечить выполнение следующих условий: 1) межатомные расстояния должны согласоваться с ЯЭО между протонами удаленных по аминокислотной последовательности остатков (рис. 13); 2) торсионные углы ϕ , ψ и χ^1 должны соответствовать КССВ ${}^3J_{H-N-C^\alpha-H}$ (табл. 3), ${}^3J_{H-C^\alpha-C^\beta-H}$ (табл. 3) и ЯЭО-расстояниям d_1 , d_2 и d_3 между протонами соседних по аминокислотной последовательности остатков [2]; 3) медленно обменивающиеся с растворителем протоны NH-групп (табл. 1) должны участвовать в образовании внутримолекулярных водородных связей или быть экранированными от растворителя; 4) молекула инсектотоксина I_5A должна содержать четыре дисульфидные связи. Кроме этих обусловленных экспериментальными данными условий необходимо выполнение следующих априорных ограничений: молекула должна иметь плотную упаковку и находиться в энергетическом минимуме. Таким образом, пространственная

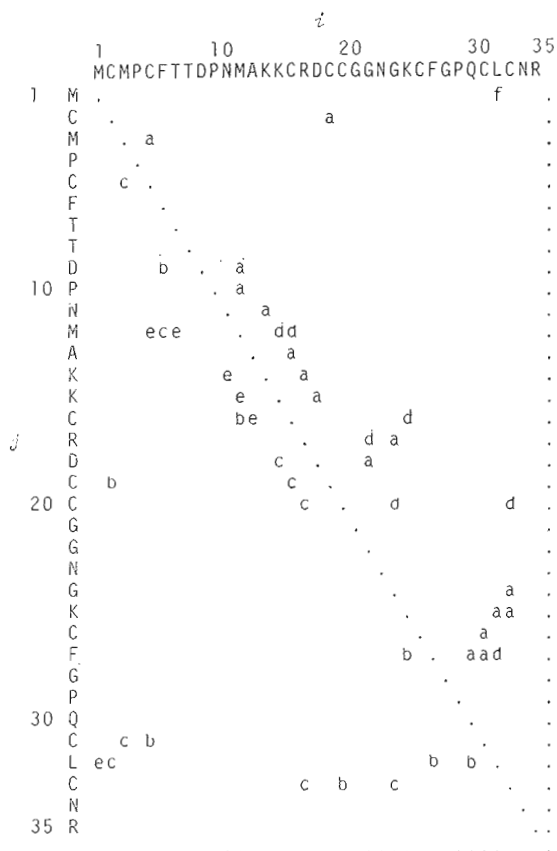


Рис. 13. Контакты между псевдоатомами удаленных по аминокислотной последовательности i -го и j -го остатков инсектотоксина I_5A , идентифицированные в NOESY-спектрах: a — контакт псевдоатомов $\alpha\alpha$, b — $\beta\beta$, c — $\alpha\beta$, d — $\beta\alpha$, e — $\beta\alpha$ и $\alpha\beta$, f — $\alpha\alpha$ и $\beta\alpha$. Каждый контакт указан сверху или внизу относительно диагонали

структура полипептида, даже такого короткого, как инсектотоксин, является сложной функцией большого числа экспериментальных и теоретических параметров. Поэтому очевидно, что полный конформационный ЯМР-анализ пептида может быть выполнен только с помощью ЭВМ, позволяющих манипулировать большим массивом данных.

Конформация фрагментов инсектотоксина I_5A . Основываясь на имеющихся экспериментальных данных, можно дать описание отдельных структурных фрагментов молекулы инсектотоксина I_5A в атомном приближении без использования ЭВМ.

Участок молекулы инсектотоксина I_5A от Asp⁹ до Cys¹⁹, показанный на рис. 14, представляет собой комбинацию β -изгиба (фрагмент 9–12) и правой α -спирали (фрагмент 12–19). Эта конформация удовлетворяет следующим экспериментальным данным: 1) протоны, сближенные до расстояния меньше 3,5 Å, дают кросс-пики ЯЭО в NOESY-спектрах (соответствующие контакты показаны на рис. 14 стрелками); 2) медленно обменивающиеся с растворителем амидные протоны NH (табл. 1) образуют внутримолекулярные водородные связи (обозначены на рис. 14 точками, соединяющими амидный протон и атом кислорода карбонильной группы); 3) углы φ соответствуют значениям КССВ ${}^3J_{H-N-C\alpha-H}$ (табл. 3, рис. 15), ориентация боковых цепей остатков (углы χ^1) соответствуют значениям КССВ ${}^3J_{H\alpha-H\beta}$ (табл. 3) и данным о ЯЭО между пространственно сближенными протонами.

Исходя из аналогичных критериев, построена конформация участка молекулы инсектотоксина I_5A от остатка Asn²³ до Asn³⁴ показанная на

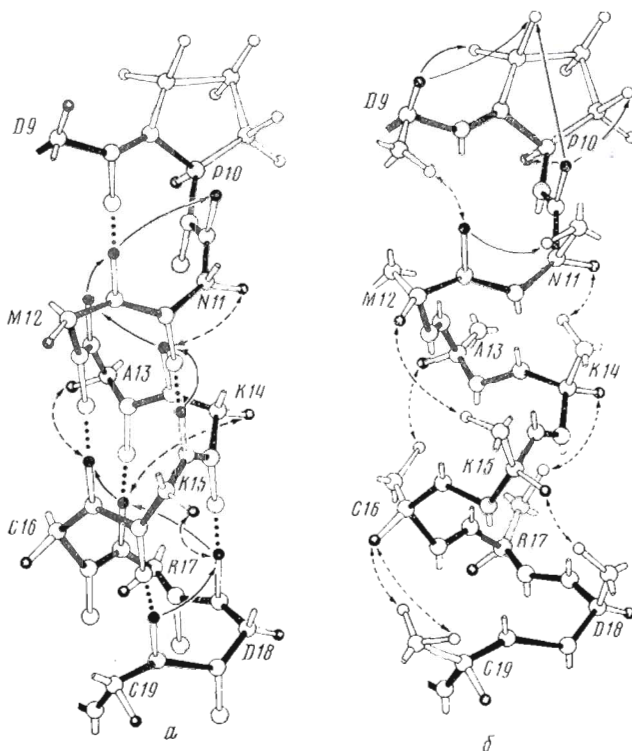


Рис. 14. Конформация участка (от Asp⁹ до Cys¹⁹) молекулы инсектотоксина I₅A *B. eupreus*. Стрелками отмечены протоны, между которыми наблюдаются ЯЭО в NOESY-спектрах: а — между протонами NH и C^αH основной цепи, б — между протонами основной цепи и боковых группировок. Сплошные и штриховые стрелки связывают соответственно протоны соседних [2] и удаленных по аминокислотной последовательности остатков. Четырьмя точками обозначены внутримолекулярные водородные связи

рис. 16. Она представляет собой антипараллельную β-структуру с β-изгибом, образуемым остатками Phe²⁷ — Gln³⁰. Кроме того, ряд контактов (не показаны на рис. 16) между боковыми цепями аминокислотных остатков (табл. 4) также согласуются с представленной конформацией. Например, протоны ароматического кольца Phe²⁷ пространственно сближены (дают ЯЭО в NOESY-спектрах) с протонами боковых цепей и амидными протонами остатков Leu³² и Lys²⁵ (рис. 8 и 12).

Анализ полной пространственной структуры инсектотоксина I₅A с помощью дистанционного алгоритма в псевдоатомном приближении. Дистанционный геометрический алгоритм генерирует декартовы координаты атомов молекулы, удовлетворяющие ограничениям по расстояниям между атомами, налагаемым ковалентной структурой молекулы и экспериментальными данными [15–19]. Существующая версия дистанционного геометрического алгоритма позволяет находить координаты 100–150 атомов [18]. Поэтому даже для такого короткого пептида, как инсектотоксин, нельзя использовать атомное описание молекулы. В настоящей работе использовано псевдоатомное приближение дистанционного геометрического алгоритма [20]. В этом приближении каждый аминокислотный остаток (за исключением глицина) состоит из двух псевдоатомов: псевдоатома α, в который входят атомы группы NH-C^α-H-CO, и псевдоатома β, в который входят все атомы боковой цепи. В качестве экспериментальных ограничений использованы данные (рис. 13) о ЯЭО между индивидуальными протонами, полученные при анализе спектров инсектотоксина.

Для инсектотоксина I₅A показано, что в NOESY-спектрах с τ_M 100 мс кросс-пик ЯЭО проявляется, если расстояние между взаимодействующими протонами не превышает 3,0–3,5 Å [2]. Поскольку интенсивность кросс-пиков ЯЭО в NOESY-спектре зависит от многих факторов (по известно,

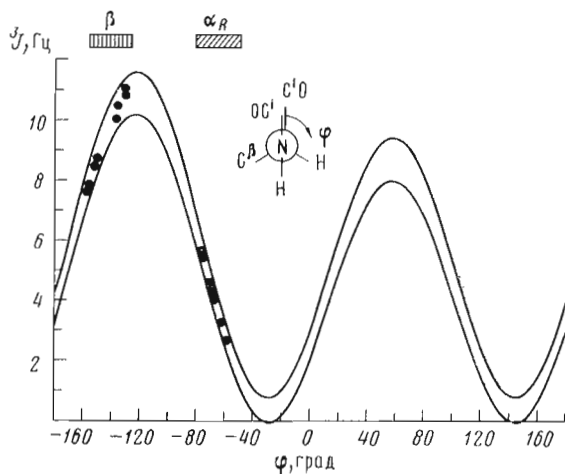


Рис. 15. Эмпирическая зависимость КССВ $^3J_{\text{H-N-C}^\alpha\text{-H}}$ от торсионного угла φ [6]. Заштрихованные прямоугольники в верхней части рисунка показывают области значений угла φ , характерные для правой α -спирали ($\varphi = -65 \pm 15^\circ$) и антипараллельной β -структуры ($\varphi = -140 \pm 15^\circ$). Кругами нанесены экспериментальные значения КССВ (табл. 3), умноженные на 1,09 для учета электроотрицательности заместителя [6], отвечающие аминокислотным остаткам, расположенным на участках правой α -спирали (рис. 14) и антипараллельной β -структуры (рис. 16) инсектотоксина I₅A

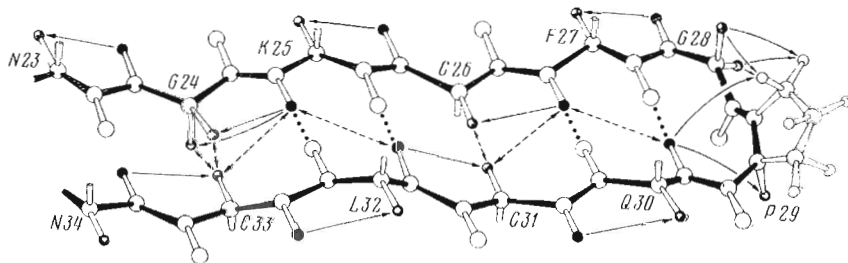


Рис. 16. Конформация основной цепи участка антипараллельной β -структуры инсектотоксина I₅A *B. eupreus*. Стрелками отмечены протоны, между которыми наблюдаются ЯЭО в NOESY-спектрах. Сплошные и штриховые стрелки связывают протоны соответственно соседних [2] и удаленных по аминокислотной последовательности остатков. Четырьмя точками обозначены внутримолекулярные водородные связи

что при коротких τ_M она обратно пропорциональна шестой степени межатомного расстояния [24]), использована грубая оценка расстояний. Если между протонами, входящими в состав двух псевдоатомов, наблюдается кросс-пик ЯЭО, мы полагаем, что расстояние между поверхностями сфер, аппроксимирующих псевдоатомы, меньше либо равно 1,5 Å.

Опубликованные версии дистанционного геометрического алгоритма, единственного алгоритма применяемого до настоящего времени для конформационного ЯМР-анализа пептидов [14, 18], учитывают только ограничения по расстояниям. Поэтому в данной работе разработано дополнение к этому алгоритму, учитывающее плотную упаковку молекулы. Пространственные структуры глобулярных белков имеют практически одинаковую плотность упаковки, равную 0,75, которая соответствует максимальной упаковке идентичных сфер [22]. Для учета принципа плотной упаковки глобулярных белков к минимизируемой в дистанционном геометрическом алгоритме квадратичной функции ошибок (см. «Экспериментальную часть») добавили следующий член:

$$F(r_1, \dots, r_N, R_0) = [R^2(r_1, \dots, r_N) - R_0^2]^2,$$

где N — число псевдоатомов, $R(r_1, \dots, r_N)$ — радиус молекулы, определяемый координатами r псевдоатомов, а R_0 — целевое значение радиуса моле-

кулы. Согласно работе [23],

$$R(r_1, \dots, r_N) = \left(\frac{5}{3}\right)^{1/2} \left(\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N r_{ic}^2\right)^{1/2},$$

где r_{ic} — расстояние между псевдоатомом i и геометрическим центром молекулы. Значение радиуса молекулы инсектотоксина R_0 , равное $10,4 \text{ \AA}$, определено исходя из объемов всех составляющих полипептидную цепь атомных групп и плотности упаковки $0,75$ [22]. Проверка этого метода определения радиуса молекулы на белках с известной пространственной структурой показала, что он дает несколько заниженное (на $5-10\%$) значение радиуса. Поэтому в случае инсектотоксина целевое значение радиуса молекулы R_0 варьировалось в диапазоне $10,8-11,6 \text{ \AA}$. По данным рис. 13 с помощью дистанционного геометрического алгоритма с учетом принципа плотной упаковки получены координаты 15 структур, для которых значения квадратичной функции ошибок (см. «Экспериментальную часть») лежат в диапазоне $10^{-3}-10^{-6} \text{ \AA}^4$. Низкое значение функции ошибок свидетельствует, что ковалентный остов молекулы не напряжен и конформация удовлетворяет экспериментальным ограничениям по расстояниям. Количественное сравнение 15 конформаций по методу, предложенному в работе [23], показало, что среднеквадратичное отклонение координат псевдоатомов между ними равно $2,1 \pm 0,3 \text{ \AA}$ ($1,7 \pm 0,3 \text{ \AA}$ с учетом только α -псевдоатомов). Эти результаты дают оценку точности, с которой может быть определена пространственная структура инсектотоксина I_5A в использованном нами приближении.

В работе [24] предложен способ идентификации участков вторичной структуры белков по координатам C^α -атомов, найденным методом рентгеноструктурного анализа. На рис. 17 приведены результаты применения этого способа для анализа 15 конформаций инсектотоксина I_5A , полученных с помощью дистанционного геометрического алгоритма. Этот анализ обнаруживает четко выраженный спиральный участок, включающий остатки от 11 до 20, и два участка развернутой структуры (остатки 23-27 и 30-34), соединенные реверсивным поворотом (остатки 27-30). Тенденция к образованию реверсивного поворота проявляется также на участке (остатки 20-23) перехода от спирали к развернутой структуре. N-Концевой участок молекулы инсектотоксина I_5A не обнаруживает склонности к образованию вторичной структуры какого-либо определенного типа.

Дисульфидные связи. К сожалению, при конформационном анализе инсектотоксина I_5A нельзя использовать положение дисульфидных связей, поскольку их не удалось определить химическим путем [1, 2]. Прямых спектральных способов локализации S-S-связей пока не существует. Поэтому мы попытались хотя бы частично решить эту проблему, комбинируя косвенные данные, параметры ЯМР-спектров и построение пространственных структур.

Инсектотоксин I_5A имеет восемь остатков цистеина в положениях 2, 5, 16, 19, 20, 26, 31 и 33 полипептидной цепи. Следовательно [25], возможно $(8-1)!! = 105$ вариантов образования дисульфидных связей. С учетом того, что для каждого из 105 вариантов нужно сделать несколько попыток согласования, перебор всех возможностей занял бы слишком много машинного времени. Поэтому проведен статистический анализ возможностей замыкания дисульфидных связей на базе полученных без учета S-S-связей результатов. В табл. 4 приведены данные для построенных ранее 15 конформаций о расстояниях между центрами псевдоатомов, аппроксимирующими боковые цепи цистиновых остатков. В рамках псевдоатомного приближения при образовании дисульфидной связи это расстояние равно $4,7 \text{ \AA}$. Если минимальное полученное расстояние между β -псевдоатомами цистиновых остатков превышало $6,5 \text{ \AA}$, мы исключали возможность образования дисульфидной связи. Число вариантов можно еще уменьшить, если принять во внимание вторичную структуру инсектотоксина и правила отбора, которым должны удовлетворять цистины, участвующие в образовании дисульфидной связи, сформулированные в работе [26]. Со-

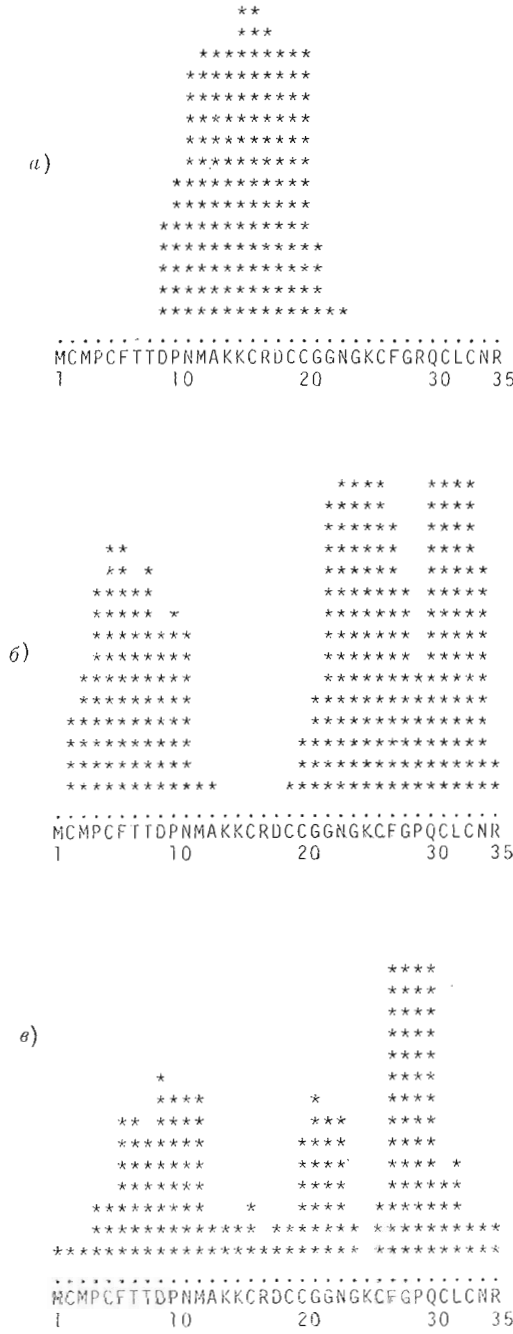


Рис. 17. Гистограмма местонахождения аминокислотных остатков в участках спиральной структуры (а), развернутой структуры (б) и в реверсивных поворотах (в) для 15 конформаций инсектотоксина I₅A. По оси абсцисс указана в одиобуквенном коде аминокислотная последовательность инсектотоксина

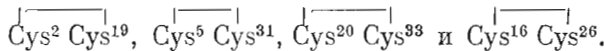
гласно этим правилам, невозможно образование дисульфидной связи между остатками Cys¹⁶ и Cys¹⁹ (так как они расположены в спиральном участке), Cys³¹ и Cys³³ (так как они расположены в участке развернутой структуры), Cys¹⁹ и Cys²⁰ (так как это соседние по аминокислотной последовательности остатки). Кроме того, согласно правилам отбора [26], невозможно образование дисульфидных связей между остатками Cys²⁰ и Cys²⁶, Cys¹⁶ и Cys²⁰. Простой комбинаторный анализ данных табл. 4 и учет правил отбора [26] показывает, что возможны следующие 10 вариантов

Статистические данные о расстояниях (d , Å) между β -псевдоатомами остатков цистина для 15 конформаций инсектотоксина I₅A

Cys Cys		$d_{\text{мин}}$	$d_{\text{макс}}$	Cys Cys		$d_{\text{мин}}$	$d_{\text{макс}}$
2	5	5,0	10,0	20	26	7,9	13,8
2	16	5,0	9,9	2	31	4,7	9,1
5	16	4,7	10,0	5	31	4,7	5,8
2	19	4,7	5,5	16	31	4,7	11,0
5	19	5,8	13,0	19	31	7,7	11,5
16	19	5,5	7,8	20	31	8,9	12,5
2	20	4,7	9,4	26	31	4,7	9,9
5	20	9,0	15,4	2	33	4,7	9,4
16	20	5,0	8,9	5	33	4,9	13,4
19	20	5,1	6,6	16	33	4,7	8,4
2	26	8,8	13,4	19	33	4,7	10,1
5	26	5,4	14,8	20	33	4,7	5,2
16	26	4,7	10,1	26	33	5,3	10,4
19	26	11,1	15,2	31	33	4,7	9,6

замыкания дисульфидных связей: 1) 2-16, 5-19, 20-33, 26-31; 2) 2-19, 5-16, 20-33, 26-31; 3) 2-19, 5-26, 16-31, 20-33; 4) 2-19, 5-31, 16-26, 20-33; 5) 2-20, 5-16, 19-33, 26-31; 6) 2-20, 5-19, 16-31, 26-33; 7) 2-20, 5-19, 16-33, 26-31; 8) 2-20, 5-26, 16-31, 19-33; 9) 2-20, 5-31, 16-26, 19-33; 10) 2-31, 5-19, 16-26, 20-33.

Три пары β -псевдоатомов остатков Cys² и Cys¹⁹ ($d_{\text{макс}}$ 5,5 Å), Cys⁵ и Cys³¹ ($d_{\text{макс}}$ 5,8 Å) и Cys²⁰ и Cys³³ ($d_{\text{макс}}$ 5,2 Å) оказываются наиболее близкими во всех 15 конформациях (см. табл. 4). Поэтому наиболее вероятной представляется система дисульфидных связей



Структура, построенная с помощью дистанционного геометрического алгоритма для этой системы дисульфидных связей, показана на рис. 18. Следует отметить, что дисульфидные связи в инсектотоксине расположены в одной области пространственной структуры молекулы (рис. 18) таким образом, что возможна реализация любого из перечисленных 10 вариантов образования системы дисульфидных связей без значительного изменения конформации. В этом смысле молекула инсектотоксина оказалась нетипичным примером для предложенного способа определения дисульфидных связей. Проведенный анализ позволил лишь сократить число возможных вариантов с первоначальных 105 до 10. Эти данные могут оказаться полезными для выработки стратегии локализации дисульфидных связей в инсектотоксине химическими методами.

Для дальнейшего повышения точности определения пространственной структуры, очевидно, необходимо использовать атомное описание молекулы и привлечь дополнительные экспериментальные данные, в том числе о КССВ протонов Н-Н-С ^{α} -Н и Н-С ^{α} -С ^{β} -Н, о внутримолекулярных водородных связях и другие результаты. Для этого необходима дальнейшая модификация дистанционного геометрического алгоритма, поскольку существующая версия позволяет находить декартовы координаты только для 100-150 атомов [14, 18]. Кроме того, учет КССВ в дистанционном геометрическом алгоритме осложняется тем, что одному значению КССВ протонов Н-Н-С ^{α} -Н и Н-С ^{α} -С ^{β} -Н, вообще говоря, соответствуют четыре значения торсионного угла φ и χ^1 . Развитие методики дистанционного геометрического алгоритма и получение координат атомов инсектотоксина I₅A будет целью нашей дальнейшей работы.

В заключение представляется интересным сравнить полученные данные о пространственной структуре инсектотоксина I₅A *B. eupreus* с результатами рентгеноструктурного анализа пространственной структуры токсина V-3 из ядра скорпиона *Centruroides sculpturatus* [27]. Токсин V-3

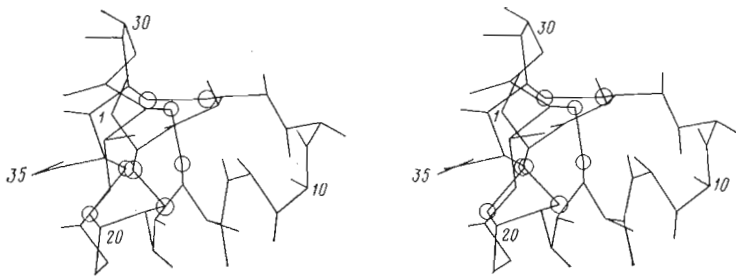


Рис. 18. Стереоскопическое изображение конформации инсектотоксина I₅A *B. eupreus*, полученной с помощью дистанционного геометрического алгоритма по данным спектроскопии ЯМР

принадлежит к гомологичной группе «длинных» (60–70 аминокислотных остатков) скорпионовых токсинов, представители которой действуют на быстрые натриевые каналы электровозбудимой мембраны [28]. Инсектотоксин I₅A принадлежит к сравнительно немногочисленной гомологической группе «коротких» токсинов, которые, согласно данным [1], действуют на глутаматный рецептор постсинаптической мембраны насекомых. Несмотря на отсутствие гомологии в аминокислотных последовательностях «длинных» и «коротких» токсинов из яда скорпионов и различное биологическое действие, пространственные структуры инсектотоксина I₅A и токсина V-3 имеют значительное сходство. Оба токсина имеют участки правой α-спирали и антипараллельной β-структуры (с примерно одинаковым числом аминокислотных остатков), скомпенованные друг относительно друга в пространстве сходным образом ([27] и рис. 18). Токсин V-3, однако, в отличие от инсектотоксина I₅A имеет дополнительно 30 остатков, расположенных в N- и C-концевых областях молекулы. Предполагается, что именно эта часть молекулы «длинных» скорпионовых токсинов ответственна за их биологическую активность [27]. Поэтому не исключено, что структурное сходство «длинных» и «коротких» токсинов с точки зрения их биологического действия не является функциональным. Весьма вероятно, что эти молекулы имеют одного и того же предшественника, но находятся на разных стадиях процесса эволюции.

Экспериментальная часть

Выделение инсектотоксина I₅A из яда скорпиона *Buthus eupreus* описано в работе [1], аминокислотная последовательность определена в работе [2].

Двумерные ¹H-ЯМР COSY-, NOESY- и J-спектры получены на спектрометре с рабочей частотой 500 МГц типа Bruker WM-500, оснащенного ЭВМ Aspect 2000. Спектры 0,011 М растворов инсектотоксина в H₂O и ²H₂O снимали в 5-мм ампуле, температура и значение pH растворов указаны в подписях к рисункам и таблицам. COSY- и NOESY-эксперименты проводились как описано в работе [2].

Химические сдвиги сигналов в спектрах ¹H-ЯМР измерены относительно внутреннего стандарта — натриевой соли 3-триметилсилил [2,2,3,3-²H]-пропионата с точностью ±0,01 м.д. Для измерения pH водных растворов использовали прямые показания pH-метра типа Orion Research-601 с комбинированным электродом Ingold 405 МЗ. Для изменения pH вводили соответствующие количества 0,05 н. растворов ²HCl и KO²H.

Двумерные J-спектры получены с помощью последовательности из двух неселективных 90- и 180°-ных импульсов [29–31]:

$$\left(90^\circ - \frac{t_1}{2} - 180^\circ - \frac{t_1}{2} - t_2\right)_n, \quad (1)$$

где t_1 и t_2 — периоды эволюции и наблюдения сигнала соответственно. Для получения двумерного J-спектра измерения были проведены для набора из 32 эквидистантных значений t_1 , лежащих в диапазоне 0,1–204,9 мс с ша-

гом 6,4 мс. После окончания времени t_2 , равного 819,2 мс, спиновая система релаксировала до стационарного состояния в течение 1,2 с. В эксперименте использовали квадратурное детектирование. При накоплении J -спектра импульсная последовательность (1) повторялась 16 раз с различными фазами неселективных 90- и 180°-ных импульсов [32, 33]. Для улучшения динамического диапазона спектра сигнал растворителя (HO^2H) насыщали слабым ($\gamma\text{H}_2 \sim 1$ Гц) селективным радиочастотным полем в течение всего эксперимента, за исключением времени наблюдения сигнала t_2 [34]. После окончания накопления спектральных данных получали матрицу 32×8192 точек. Перед Фурье-преобразованием эта матрица умножалась на следующие функции, уменьшающие полуширину сигналов в спектре:

$$\begin{aligned} \sin [\pi(t_1+t_{01})/t_{S1}] & \text{ для } t_1\text{-направления,} \\ \sin^2 [\pi(t_2+t_{02})/t_{S2}] & \text{ для } t_2\text{-направления} \end{aligned}$$

($t_{01}/t_{S1} = 1/64$ и $t_{02}/t_{S2} = 1/16$) и дополнялась нулями до размера 256×16384 точек. После Фурье-преобразования получали матрицу данных в частотной области размером 256×8192 точек, что соответствовало разрешению 0,6 Гц по оси химических сдвигов (δ) и 0,3 Гц по оси констант спин-спиновой взаимодействия (J).

Одномерные спектры ^1H -ЯМР растворов инсектотоксина I_5A в H_2O и $^2\text{H}_2\text{O}$ снимали на спектрометрах типа WM-500 Bruker и SC-300 Varian в режиме импульсного облучения. Для исследования рН-зависимости химических сдвигов сигналов алифатических протонов использовали сочетание гомоядерного двойного резонанса и разностной спектроскопии [35].

Зависимости химических сдвигов сигналов от рН среды были согласованы на ЭВМ по методу наименьших квадратов с теоретическим уравнением

$$\delta_{\text{набл}} = \delta_{\text{H}^+} - \Delta\delta \cdot 10^{h(\text{pH} - \text{p}K_a)} / (1 + 10^{h(\text{pH} - \text{p}K_a)}), \quad (2)$$

где $\delta_{\text{набл}}$ и δ_{H^+} — химический сдвиг сигнала, наблюдаемый при данном значении рН и отвечающий протонированному состоянию ионогенной группы соответственно; $\text{p}K_a = -\lg K_a$, K_a — константа диссоциации ионогенной группы; $\Delta\delta$ — изменение химического сдвига при депротонировании ионогенной группы, h — коэффициент Хилла.

Время полубомена $t_{1/2}$ протонов NH с дейтерием растворителя ($^2\text{H}_2\text{O}$) определены согласованием на ЭВМ по методу наименьших квадратов экспериментальной зависимости интенсивности сигналов от времени t с уравнением

$$t_{1/2} = 0,693t / \ln \left(\frac{I_0}{I_t} \right), \quad (3)$$

где I_0 — интенсивность сигнала в начальный момент, I_t — интенсивность сигнала в момент времени t . В качестве стандарта интенсивности использовали сигналы ароматических протонов остатков фенилаланина.

Программа «Дистанционный геометрический алгоритм» любезно предоставлена доктором В. Брауном (Цюрих). Эта программа, подробно описанная в работе [18], позволяет находить декартовы координаты N -атомов $\{r_i = (x_i, y_i, z_i), i = 1, \dots, N\}$, удовлетворяющие дистанционным ограничениям:

$$L_{ij} \leq |r_i - r_j| \leq U_{ij}, \quad (4)$$

где L_{ij} — нижняя граница, а U_{ij} — верхняя граница расстояния $|r_i - r_j|$ между центрами атомов i и j . Для этого программа минимизирует функцию ошибок

$$F(r_1, \dots, r_N) = \sum_{i < j} (|r_i - r_j|^2 - U_{ij}^2)^2 + \sum_{k < l} (L_{kl}^2 - |r_k - r_l|^2)^2, \quad (5)$$

где Σ' означает, что суммирование производится только по членам, нарушающим дистанционные ограничения, заданные уравнением (4).

Для характеристики различия двух пространственных структур A и B , состоящих из N -псевдоатомов, использовали среднеквадратичное отклонение [23]:

$$\left[\frac{2}{N(N-1)} \sum_{i>j} (r_{ij}^A - r_{ij}^B)^2 \right]^{1/2}, \quad (6)$$

где r_{ij}^A и r_{ij}^B — расстояния между i и j псевдоатомами в структурах A и B соответственно.

Авторы выражают благодарность д-ру В. Брауну (Цюрих, Швейцария) за предоставление программы дистанционного геометрического алгоритма и А. З. Гуревичу за программу для согласования данных по pH-зависимости химических сдвигов сигналов с теоретическим уравнением (2).

ЛИТЕРАТУРА

1. Гришин Е. В., Волкова Т. М., Солдатов Л. Н. Биоорганич. химия, 1982, т. 8, № 2, с. 155—164.
2. Арсеньев А. С., Кондаков В. И., Майоров В. Н., Волкова Т. М., Гришин Е. В., Быстров В. Ф., Овчинников Ю. А. Биоорганич. химия, 1983, т. 9, № 6, с. 768—793.
3. Bundi A., Wuthrich K. Biopolymers, 1979, v. 18, № 2, p. 285—297.
4. Shire J. S., Hanania G. I. H., Gurd F. R. N. Biochemistry, 1974, v. 13, № 14, p. 2967—2974.
5. Zurcher R. F. In: Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 1976, v. 2, p. 206—257.
6. Bystrov V. F. In: Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 1976, v. 10, p. 41—81.
7. Nagayama K. Adv. Biophys., 1981, v. 14, № 1, p. 139—204.
8. DeMarco A., Llinas M., Wuthrich K. Biopolymers, 1982, v. 21, № 4, p. 617—636.
9. Nagayama K., Wuthrich K. Eur. J. Biochem., 1981, v. 115, № 3, p. 653—657.
10. Gung M. T., Marraud M. Biopolymers, 1982, v. 21, № 4, p. 953—967.
11. Delepierre M., Dobson C. M., Poulsen F. M. Biopolymers, 1982, v. 21, № 20, p. 4756—4761.
12. Anil Kumar, Ernst R. R., Wuthrich K. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1980, v. 95, № 1, p. 1—6.
13. Nagayama K., Anil Kumar, Wuthrich K., Ernst R. R. J. Magn. Reson., 1980, v. 40, № 2, p. 321—334.
14. Brown L. R., Braun W., Anil Kumar, Wuthrich K. Biophys. J., 1982, v. 37, № 1, p. 319—328.
15. Crippen G. M. Int. J. Pept. Prot. Res., 1979, v. 13, № 3, p. 320—326.
16. Havel T. F., Crippen G. M., Kuntz I. D. Biopolymers, 1979, v. 18, № 1, p. 73—81.
17. Crippen G. M., Havel T. F. Acta Cryst., 1978, v. A34, № 2, p. 282—284.
18. Braun W., Bosh C., Brown L. R., Go N., Wuthrich K. Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 667, № 22, p. 377—396.
19. Crippen G. M. Distance Geometry and Conformational Calculations, Chichester: Research Studies Press, 1981.
20. Braun W., Go N., Wuthrich K. Abstracts VII International Biophysics Congress and III Pan-American Biochemistry Congress, 1981, p. 73.
21. Anil Kumar, Wagner G., Ernst R. R., Wuthrich K. J. Amer. Chem. Soc., 1981, v. 103, № 13, p. 3654—3658.
22. Richards F. M. J. Mol. Biol., 1974, v. 82, № 1, p. 1—14.
23. Oobataka M., Crippen G. M. J. Phys. Chem., 1981, v. 85, № 4, p. 1187—1197.
24. Ramakrishnan C., Soman K. V. Int. J. Pept. Prot. Res., 1982, v. 20, № 3, p. 218—237.
25. Galat A. Int. J. Biochem., 1982, v. 14, № 5, p. 363—365.
26. Thornton J. M. J. Mol. Biol., 1981, v. 151, № 2, p. 261—287.
27. Fontecilla-Camps J. C., Almassy R. J., Ealick S. E., Suddath F. L., Watt D. I., Feldmann R. J., Bugg C. E. Trends in Biochem. Sci., 1981, v. 6, № 11, p. 291—296.
28. Catterall W. A. In: Neurotoxins: Tools in Neurobiology/Eds: Ceccarelli B., Clementi F. N. Y.: Raven Press, 1979, p. 305—316.
29. Aue W. P., Bartholdi E., Ernst R. R. J. Chem. Phys., 1976, v. 64, № 5, p. 2229—2246.
30. Nagayama K., Wuthrich K., Bachman P., Ernst R. R. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1977, v. 78, № 1, p. 99—105.
31. Nagayama K., Bachman P., Wuthrich K., Ernst R. R. J. Magn. Reson., 1978, v. 31, № 1, p. 133—148.
32. Nagayama K., Wuthrich K., Ernst R. R. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1979, v. 90, № 1, p. 305—311.

33. Jeener J., Meier B. H., Bachman P., Ernst R. R. J. Chem. Phys., 1979, v. 71, № 13, p. 4546-4553.
34. Anil Kumar, Wagner G., Ernst R. R., Wuthrich K. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1980, v. 96, № 3, p. 1156-1163.
35. Bystrov V. F., Arseniev A. S., Gavrilov Yu. D. J. Magn. Reson., 1978, v. 30, № 2, p. 151-184.

Поступила в редакцию
13.V.1983

NMR CONFORMATIONAL ANALYSIS OF THE SPATIAL STRUCTURE OF INSECTOTOXIN I₅A *BUTHUS EUPEUS*

ARSENIYEV A. S., KONDAKOV V. I., MAIOROV V. N.,
BYSTROV V. F., OVCHINNIKOV YU. A.

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

¹H NMR spectroscopy has been used to collect data related to the spatial structure of insectotoxin I₅A *Buthus eupeus*: pH-dependence of the chemical shifts, deuterium exchange rates of individual amide hydrogens, spin-spin coupling of the H-N-C^α-H and H-C^α-C^β-H protons, and nuclear Overhauser effect between distinct protons belonging to amino acid residues remote in the sequence. Molecular conformation in the regions from Asp⁹ to Cys¹⁹ (β-turn 9-12 and right-hand α-helix 12-19) and from Asn²³ to Asn²⁴ (antiparallel β-sheet with the β-turn 27-30) directly follows from the observed parameters. Pseudoatomic approach of distance geometry algorithm was used to solve the overall folding of the molecule and propose the most probable set of disulfide bridges: Cys² - Cys¹⁹, Cys⁵ - Cys³¹, Cys¹⁶ - Cys²⁶ and Cys²⁰ - Cys³³. The spatial structure of insectotoxin I₅A *B. eupeus* demonstrates remarkable similarity with that of a «long» type scorpion neurotoxin V-3 *Centruroides sculpturatus*.