



УДК 577.322.5:591.145.2-812.6:543

2-D-ЯМР-ИССЛЕДОВАНИЕ КОНФОРМАЦИОННЫХ
ОСОБЕННОСТЕЙ ТОКСИНА 3 ИЗ ЯДА КОБРЫ

NAJA NAJA SIAMENSIS

Кондаков В. И., Арсеньев А. С., Плужников Ы. А.,
Цетлин В. И., Быстров В. Ф., Иванов В. Т.Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Методами двумерной ^1H -ЯМР-спектроскопии (500 МГц) исследовано пространственное строение «длинного» токсина 3 *Naja naja siamensis* в растворе. Отнесение сигналов 67 остатков из 71 остатка молекулы и данные о ядерном эффекте Оверхаузера между протонами позволили сравнить конформации токсина при различных значениях pH и температуры. Показано, что в депротонированном состоянии ($\text{pH} \geq 7,5$) имидазольное кольцо остатка His²² окружено боковыми цепями остатков Cys¹⁷, Pro¹⁸, Val²³, Cys²⁴, Cys⁴⁵, Ala⁴⁶ и Thr⁴⁸, а в протонированном состоянии ($\text{pH} < 4,0$) имидазольное кольцо His²² экспонировано в растворитель. Ионизация боковой цепи остатка His²² сопровождается изменением ориентации ароматического кольца Tyr²⁵, а также влияет на конформационную подвижность боковых цепей остатков Cys¹⁷, His²², Cys⁴⁵ и Ala⁴⁷. Обнаруженные конформационные особенности токсина 3 в растворе обсуждаются в связи с кинетическими различиями в связывании длинных и коротких нейротоксинов с ацетилхолиновым рецептором.

Токсин 3 (« α -кобротоксин») из яда кобры *Naja naja siamensis* принадлежит к группе «длинных» полипептидных нейротоксинов змей ($M \sim 8000$), блокирующих передачу нервного импульса в организме путем специфического связывания с ацетилхолиновым рецептором [1, 2]. Некоторые особенности структуры и физиологического действия «коротких» и «длинных» нейротоксинов обуславливают целесообразность сравнительного исследования их конформационного поведения в растворе. В частности, это вызвано появлением данных о кристаллической структуре двух нейротоксинов длинного типа: токсина 3 *N. n. siamensis* [3] и α -бунгаротоксина *Bungarus multicinctus* [4, 5], которые продемонстрировали ряд различий в пространственной организации как между этими токсинами, так и по сравнению с «короткими» нейротоксинами — эрабутоксинами *a* и *b* [6–9]. Кроме того, между двумя группами нейротоксинов змей установлен ряд иммунологических, биохимических и фармакологических различий [10].

Исследование топографии связывания «длинных» и «коротких» нейротоксинов с ацетилхолиновым рецептором выявило сходство поверхностей связывания нейротоксинов обеих групп [11–13]. Однако эти токсины различаются по скорости ассоциации и диссоциации с ацетилхолиновым рецептором: длинные токсины ассоциируют и диссоциируют медленнее [14].

Рентгеноструктурный анализ токсина 3 *N. n. siamensis* проведен для кристалла, выращенного из водного раствора при pH 2,8 [3]. Результаты сравнительного ЯМР-исследования пространственной структуры нативного токсина и его модифицированных производных свидетельствуют о большом сходстве конформации токсина 3 в растворе с его кристаллической структурой [15]. Вместе с тем данные ЯМР и КД указывают на наличие pH-зависимого конформационного перехода в молекуле токсина 3, обусловленного депротонированием имидазольного кольца остатка His²² при переходе к физиологическим условиям pH [15, 16]. Однако использованные ранее методы исследования пространственного строения токсина 3 в растворе позволили охарактеризовать микроокружение лишь ограничен-

ного числа аминокислотных остатков и установить, что молекуле «длинного» нейротоксина присущи два конформационно-устойчивых состояния — А (при значениях $pH < 4$) и Б (для $pH \geq 7$).

В настоящей работе для более детального выяснения различий между конформационными состояниями А и Б проведены исследования пространственной структуры молекулы токсина *Z. N. n. siamensis* в растворе методами двумерной (2-D) 1H -ЯМР-спектроскопии при значениях pH 2,2 и 7,5.

Отнесение сигналов в двумерных спектрах токсина З. Одним из наиболее ответственных этапов ЯМР-исследования конформации белка является выделение сигналов в спектрах и их отнесение к определенным аминокислотным остаткам в молекуле. Только в случае решения этих вопросов можно однозначно интерпретировать полученную информацию о химических сдвигах, константах спин-спиновой взаимодействия, релаксационных параметрах конкретных ядер и использовать эти характеристики для установления пространственной структуры и динамических особенностей белковой молекулы.

Основная стратегия отнесения сигналов в двумерных 1H -ЯМР-спектрах пептидно-белковых веществ подробно изложена в ряде работ [17–22]. Она основана на методах 2-D-корреляционной (COSY) и спин-эхо-корреляционной спектроскопии (SECSY), а также на спектроскопии ядерного эффекта Оверхаузера (NOESY), которые позволяют значительно повысить разрешающую способность и информативность метода ЯМР в структурных исследованиях макромолекул в растворе.

На начальных этапах анализа двумерных спектров COSY, SECSY и NOESY в растворе 2H_2O были использованы результаты отнесения сигналов ароматических и метильных протонов токсина З в одномерных 1H -ЯМР-спектрах, полученных ранее [12, 15]. Это позволило в COSY- и SECSY-спектрах идентифицировать кросс-пики, отражающие спин-спиновые взаимодействия (J -взаимодействия) для алифатических протонов остатков Val^{23,41,52,56}, Leu⁴³ и Ile^{1,8,12,36,59}. Идентификация перечисленных спиновых систем в COSY- и SECSY-спектрах токсина З дополнительно контролировалась наблюдением ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) в NOESY-спектрах, полученных при коротких значениях времени смешивания компонентов ядерной намагниченности (τ_M 100 мс) между метильными протонами и протонами других групп внутри данных остатков.

Выделение полных спиновых систем ароматических протонов остатков Phe^{4,33,71} проведено в SECSY-спектрах при pH 3,3 и температурах 32 и 50°С (рис. 4). Соотнесение ароматических спиновых систем остатков Phe^{4,33,71}, His^{22*}, Tyr²⁵ и Trp²⁹ с собственными алифатическими протонами выполнено с помощью ЯЭО, наблюдаемого между $C^{\alpha}H_2$ - и $C^{\beta}H_2$ -протонами в NOESY-спектрах с τ_M 100 мс [18] (рис. 2).

Этим способом были отнесены сигналы шести из 28 выделенных трехспиновых (AMX, ABX, A₂X) систем в двумерных 1H -ЯМР-спектрах токсина З. Сигналы идентифицированных алифатических спиновых систем аминокислотных остатков затем были соотнесены с собственными NH-протонами в COSY- и NOESY-спектрах токсина З в растворе H_2O при 32 и 50°С. Это позволило на начальных этапах анализа двумерных спектров провести отнесение сигналов спиновых систем остатков Ile¹, Phe⁴, Ile⁸, Ile¹², His²², Val²³, Tyr²⁵, Trp²⁹, Phe³³, Ile³⁶, Val⁴¹, Leu⁴³, Val⁵², Val⁵⁶, Ile⁵⁹ и Phe⁷¹.

Дальнейшее отнесение сигналов в двумерных спектрах токсина З основывалось на наблюдении ЯЭО между NH-протоном $i+1$ -го остатка в аминокислотной последовательности и протонами $C^{\alpha}H$, NH и $C^{\beta}H$ i -го остатка (соответственно d_{1-} , d_{2-} и d_{3-} связи [18, 21]). Данный метод позволяет проводить отнесение выделенных в COSY- и SECSY-спектрах спиновых систем к их определенному положению в первичной структуре молекулы. В качестве стартовых использовались сигналы перечисленных выше 16

* Для остатка His²² соотнесение ароматических и алифатических протонов получено только при pH 7,5 (конформационное состояние Б), поскольку при низких значениях pH (состояние А) имидазольное кольцо His²² не проявляет ЯЭО-взаимодействий с собственными $C^{\beta}H_2$ -протонами (см. ниже).

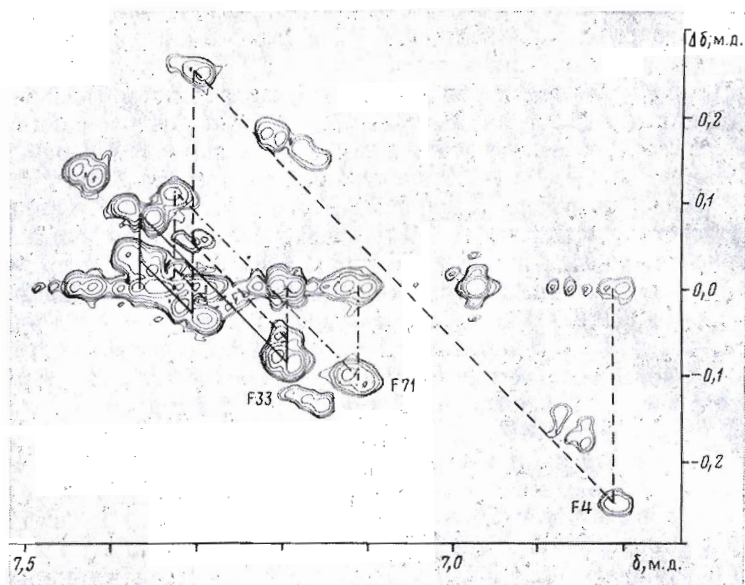


Рис. 1. Фрагмент ^1H -ЯМР-SECSY-спектра токсина *З N.n.siamensis* (32°C , $^2\text{H}_2\text{O}$, pH 3,3). J -Связи показаны для следующих ароматических спиновых систем: Phe⁴ (пунктир), Phe³³ (сплошная линия), Phe⁷¹ (штрихпунктир). Здесь и далее отнесение индивидуальных кросс-пигов приведено в однобуквенном коде аминокислотных остатков; цифры указывают положение в полипептидной цепи

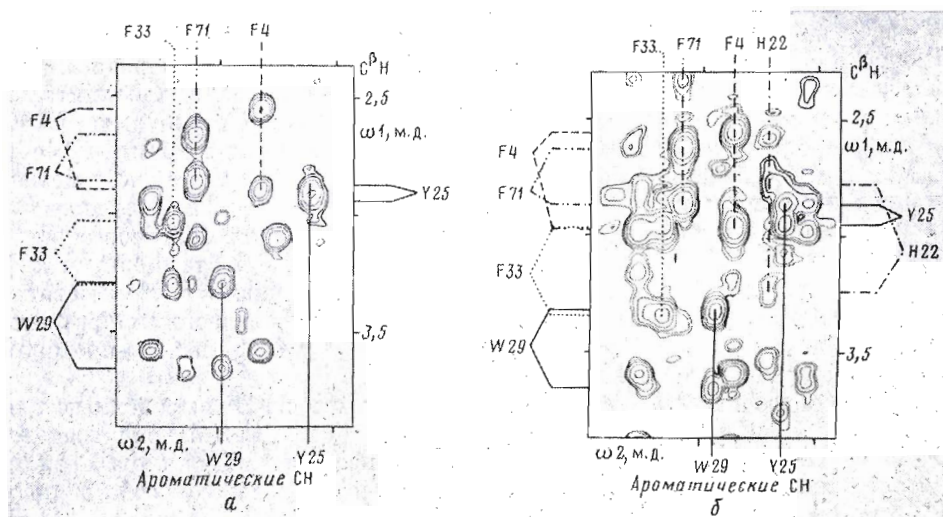


Рис. 2. Фрагменты NOESY-спектров (τ_M 100 мс) токсина *З N.n.siamensis* в $^2\text{H}_2\text{O}$ при 32°C , pH 2,2 (а) и 7,5 (б). Показано соотношение сигналов протонов C^{β}H и ароматических протонов остатков Phe^{4,33,71}, His²², Tyr²⁵, Trp²⁹

аминокислотных остатков. Для отнесения сигналов через d -связи спектры COSY и NOESY были получены в растворе H_2O при значениях pH 2,2 и 3,3 и температурах 32 и 50°C , а также при pH 7,5 и 32°C . Для облегчения анализа сильно перекрывающихся спектральных областей амидных протонов COSY- и NOESY-эксперименты проводились также в растворе $^2\text{H}_2\text{O}$ при значениях pH 2,2 и 7,5 и температуре 32°C с частично обмененными на дейтерий амидными протонами.

Большинство из обнаруженных в молекуле токсина *З* d_1 -связей приведены на комбинированных COSY-NOESY-диаграммах (рис. 3–5), которые содержат ЯЭО-кросс-пики между протонами $\text{NH } i+1$ -го и $\text{C}^{\alpha}\text{H } i$ -го остатков, соседних по аминокислотной последовательности (NOESY-спектр), и спин-

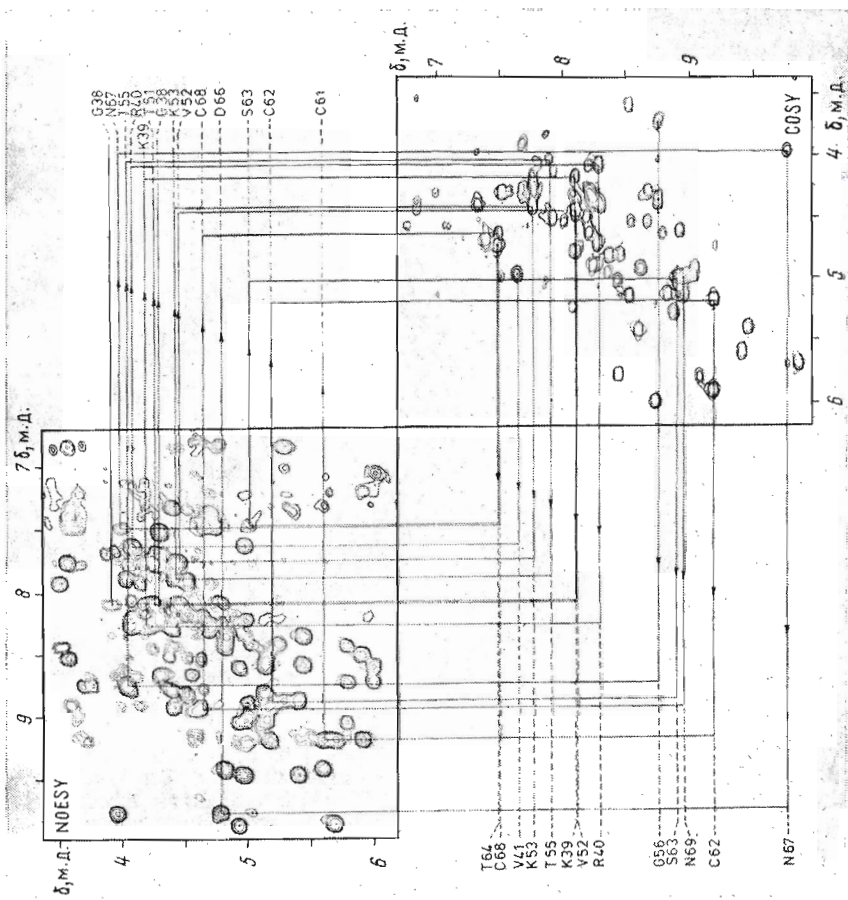


Рис. 3

Рис. 3. Комбинированная COSY-NOESY-диаграмма протонных спектров токсина 3 *N.n.siamensis* для отнесения сигналов при помощи ЯЭО между амидным протоном NH 4+1-го остатка и протоном C^αH 4-го остатка (d₁-связь). Прямые линии со стрелками указывают d₁-связи в следующих фрагментах полипептидной цепи: Phe⁴ — Ile¹; Cys⁷ — Ile² и Phe³ — Thr². Спектры получены в растворе H₂O при pH 3,3 и 50°С. Время смешивания компонентов намагниченности τ, М100 мс. Отнесение химических сдвигов амидных протонов к аминокислотным остаткам токсина 3 показано в левом нижнем квадрате, а протонов C^αH — в правом верхнем квадрате диаграммы

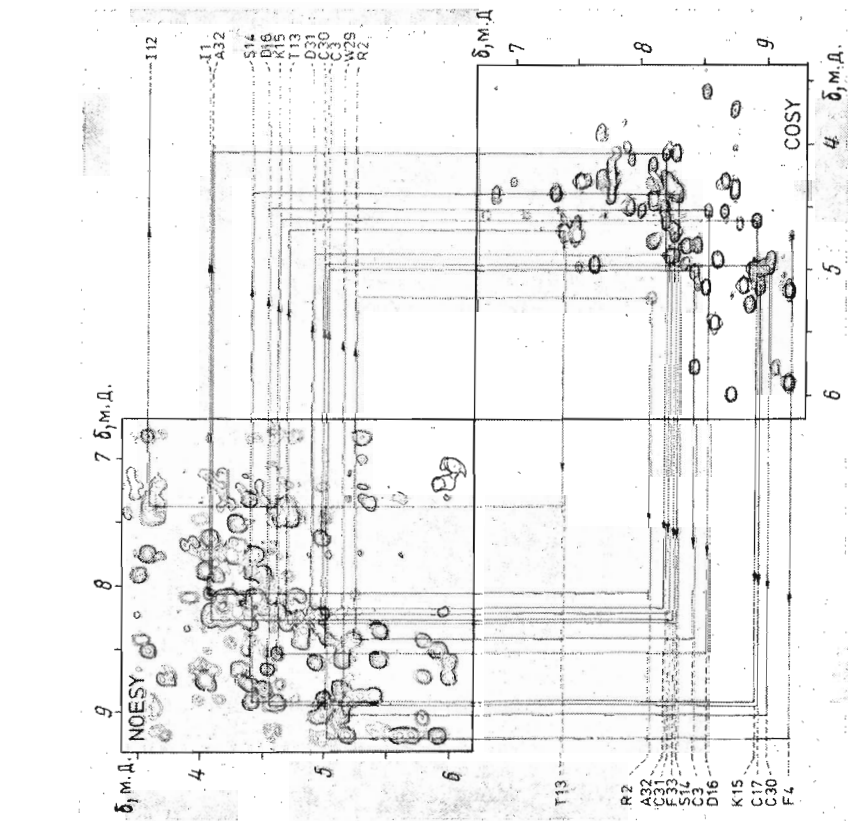


Рис. 4

Рис. 4. Комбинированная COSY-NOESY-диаграмма для отнесения сигналов при помощи ЯЭО между амидным протоном NH 4+1-го остатка и протоном C^αH 4-го остатка (d₁-связь) в следующих фрагментах полипептидной цепи: Phe⁴ — Ile¹; Cys⁷ — Ile² и Phe³ — Thr². Спектры получены в растворе H₂O при pH 3,3 и 50°С. Время смешивания компонентов намагниченности τ, М100 мс. Отнесение химических сдвигов амидных протонов к аминокислотным остаткам токсина 3 показано в левом нижнем квадрате, а протонов C^αH — в правом верхнем квадрате диаграммы

Рис. 4. Комбинированная COSY-NOESY-диаграмма для отнесения сигналов в спектрах токсина 3 *N.n.siamensis* через d₁-связи в следующих фрагментах полипептидной цепи: Val⁴ — Gly³, Gly² — Thr¹, Thr⁴ — Cys¹, Asp⁶ — Asp⁶. Экспериментальные параметры COSY- и NOESY-спектров идентичны приведенным в подписи к рис. 3

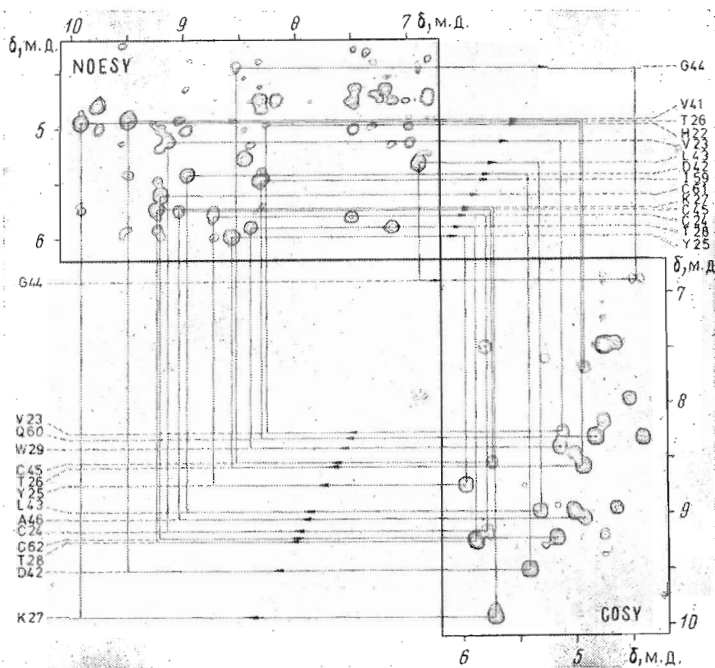


Рис. 5. Комбинированная COSY-NOESY-диаграмма для отнесения сигналов в спектрах токсина 3 *N.n.siamensis*. Прямые линии со стрелками указывают d_1 -связи между соседними остатками в следующих фрагментах полипептидной цепи: Trp²⁹ – His²², Ala⁴⁶ – Val⁴¹, а также между остатками Cys⁶²-Cys⁶⁴ и Gln⁶⁰-Ile⁵⁹. Спектры измеряли в растворе ²H₂O при pH 2,2 и 32° С. NOESY-спектр получен накоплением в течение 22 ч после накопления COSY-спектра; время смешивания компонентов намагниченности τ_M 100 мс

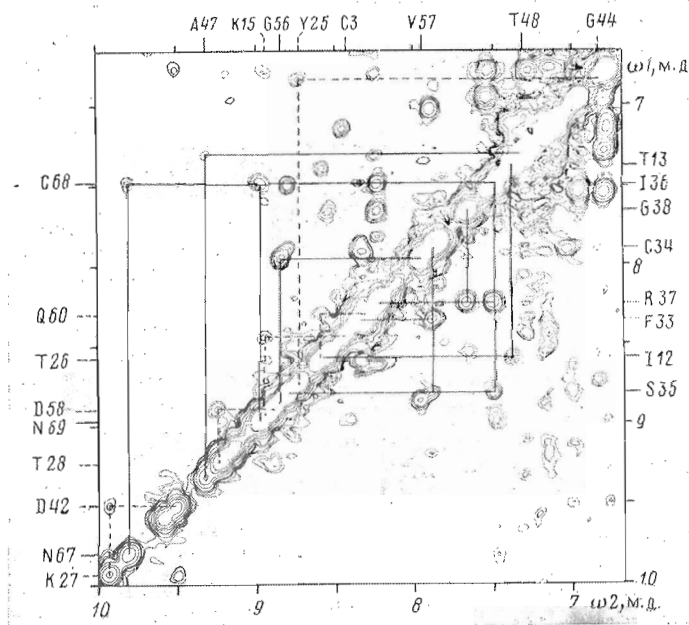


Рис. 6. Фрагмент NOESY-спектра токсина 3 *N.n.siamensis* в H₂O при 32° С и pH 3,3, τ_M 100 мс. Сплошной линией обозначены d_2 -связи для следующих фрагментов полипептидной цепи: Gly³⁸ – Phe³³, Asn⁶⁹ – Asn⁶⁷, а также Thr¹³ – Ile¹², Thr⁴³ – Ala⁴⁷ и Val³⁷ – Gly⁵⁶. Пунктиром показаны ЯЭО-взаимодействия между NH-протонами удаленных по аминокислотной последовательности остатков Cys³ и Lys¹⁵, Tyr²⁵ и Gly⁴⁴, Thr²⁶ и Gln⁶⁰, Lys²⁷ и Asp⁴², Thr²⁸ и Asp⁵⁸

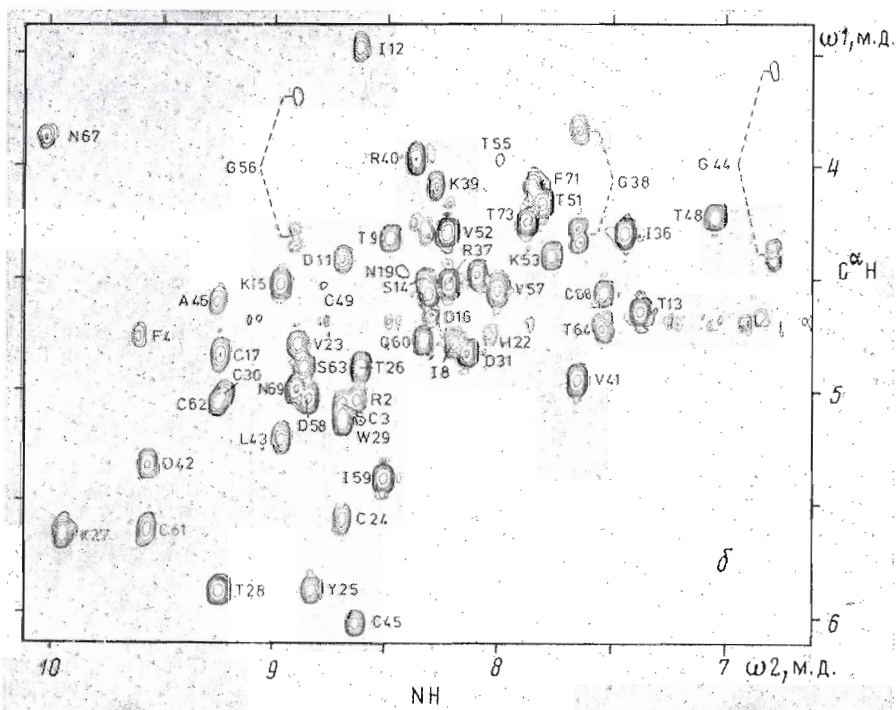
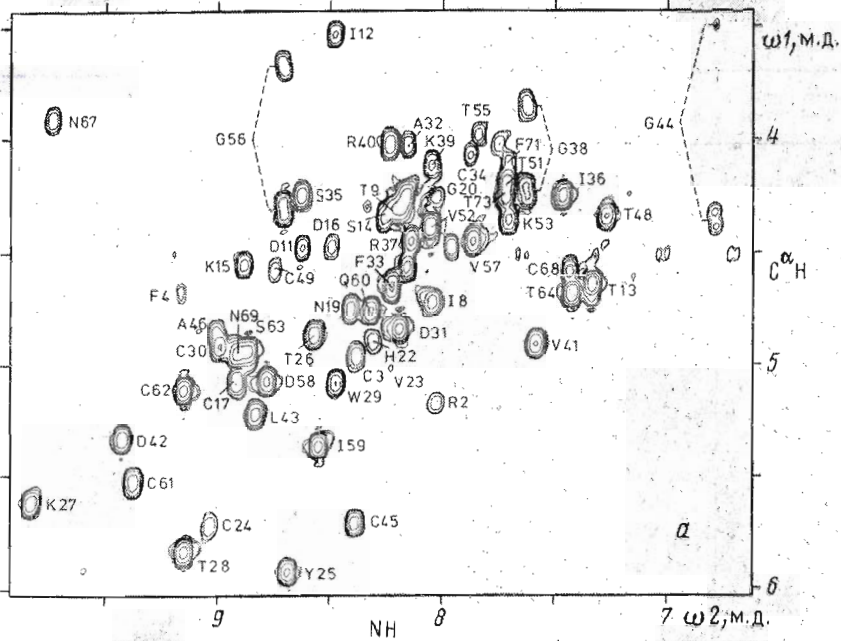


Рис. 7. Фрагменты COSY-спектров токсина 3 *N.n.siamensis* в H_2O (10% 2H_2O):
 а – pH 3,3; 50° C; б – pH 7,5; 32° C

спиновые взаимодействия между протонами $C^\alpha H$ и NH внутри остатков (COSY-спектр).

Обнаруженные в молекуле токсина 3 d_2 -связи показаны на рис. 6.

Результаты отнесения сигналов продемонстрированы на фрагментах COSY-спектров в растворах H_2O и 2H_2O (рис. 7, 8).

Идентифицированные при анализе двумерных спектров токсина 3 d_1 -, d_2 - и d_3 -связи схематически показаны на рис. 9. Из-за сильного перекры-

Химические сдвиги ($\delta \pm 0,01$ м. д.) отнесенных ^1H -ЯМР-сигналов токсина
 3 *N. n. siamensis* при pH 3,3 и 50° С

Аминокислот- ный остаток	NH	C α H	C β H	Другие протоны
Ile ¹		4,16	1,65	C γ H ₂ 1,48; 1,17 C γ H ₃ 0,68 C δ H ₃ 0,64
Arg ²	8,06	5,22	1,33; 1,18	
Cys ³	8,42	5,01	3,11; 2,13	
Phe ⁴	9,20	4,73	2,91; 2,52	C δ H ₂ 6,81; 6,81 C ϵ H ₂ 7,31; 7,31 C ζ H 7,20
Ile ⁸	8,08	4,77	1,96	C γ H ₂ 1,44; 1,38 C γ H ₃ 1,10 C δ H ₃ 0,80
Thr ⁹	8,25	4,36	4,65	C γ H ₃ 1,49
Pro ¹⁰		4,40	2,33; 2,11	C γ H ₂ 2,03; 1,86 C δ H ₂ 3,74; 3,60
Asp ¹¹	8,66	4,53	2,94; 2,94	
Ile ¹²	8,52	3,58	2,24	C γ H ₂ 1,40; 0,88 C γ H ₃ 0,79 C δ H ₃ 0,55
Thr ¹³	7,38	4,68	4,15	C γ H ₃ 1,20
Ser ¹⁴	8,30	4,39	3,31; 3,07	
Lys ¹⁵	8,92	4,61	1,73; 1,63	
Asp ¹⁶	8,53	4,53	2,74; 2,58	
Cys ¹⁷	8,95	5,13	3,65; 2,97	
Pro ¹⁸		4,24	2,33; 2,07	C γ H ₂ 1,90 C δ H ₂ 3,57; 3,47 N ϵ H ₂ 7,48; 6,90
Asn ¹⁹	8,44	4,79	2,92; 2,71	
Gly ²⁰	8,07	4,30; 3,90		C δ H 7,35 C ϵ H 8,64
His ²²	8,35	4,94	3,32; 2,89	
Val ²³	8,27	5,06	2,35	C γ H ₃ 0,90; 0,71
Cys ²⁴	9,08	5,78	3,32; 2,95	
Tyr ²⁵	8,73	5,98	2,96; 2,85	C δ H ₂ 6,63; 6,63 C ϵ H ₂ 6,59; 6,59 C γ H ₃ 1,06
Thr ²⁶	8,61	4,91	4,01	
Lys ²⁷	9,86	5,68	2,09; 1,80	
Thr ²⁸	9,19	5,89	4,05	C γ H ₃ 1,17 C δ H 6,99 C ϵ H 7,21 C ζ ³ H 6,84 C γ H 7,13 C ζ ² H 7,43 N ϵ H 10,29
Trp ²⁹	8,52	5,13	3,64; 3,34	
Cys ³⁰	9,03	4,12	3,32; 3,04	
Asp ³¹	8,23	4,88	3,09; 2,77	
Ala ³²	8,20	4,07	1,14	
Phe ³³	8,26	4,70	3,34; 3,02	C δ H ₂ 7,20; 7,20 C ϵ H ₂ 7,39; 7,39 C ζ H 7,32
Cys ³⁴	7,92	4,12	3,52; 3,20	
Ser ³⁵	8,67	4,30	4,00; 3,93	
Ile ³⁶	7,51	4,30	1,91	C γ H ₂ 1,53; 1,25 C γ H ₃ 0,98 C δ H ₃ 0,93
Arg ³⁷	8,18	4,49	1,94; 1,83	
Gly ³⁸	7,67	4,28; 3,89		
Lys ³⁹	8,09	4,17	1,51	
Arg ⁴⁰	8,27	4,07	0,65; 0,08	C γ H ₂ 1,22; 1,14 C δ H ₂ 2,96; 2,96
Val ⁴¹	7,62	4,95	1,80	C γ H ₃ 0,60; 0,53

Аминокислотный остаток	NH	C ^α H	C ^β H	Другие протоны
Asp ⁴²	9,46	5,39	3,07; 3,00	
Leu ⁴³	8,87	5,27	1,63; 1,49	C ^γ H 1,60 C ^δ H ₃ 0,97; 0,93
Gly ⁴⁴	6,83	4,41; 3,55		
Cys ⁴⁵	8,43	5,76	3,31; 2,96	
Ala ⁴⁶	9,04	4,91	1,66	
Ala ⁴⁷	9,22	4,33	1,41	
Thr ⁴⁸	7,31	4,39	4,08	C ^γ H ₃ 1,11
Cys ⁴⁹	8,79	4,63	3,05; 3,99	
Pro ⁵⁰		4,33	2,27; 1,97	C ^γ H ₂ 1,36; 0,90 C ^δ H ₂ 3,79; 3,10 C ^γ H ₃ 1,19
Thr ⁵¹	7,76	4,25	4,03	C ^γ H ₃ 0,80; 0,72
Val ⁵²	8,09	4,43	2,08	
Lys ⁵³	7,75	4,41	1,64	
Thr ⁵⁵	7,88	4,03	4,03	C ^γ H ₃ 1,26
Gly ⁵⁶	8,75	4,35; 3,72		
Val ⁵⁷	8,90	4,50	2,11	C ^γ H ₃ 0,83; 0,65
Asp ⁵⁸	8,82	5,12	2,96; 2,86	
Phe ⁵⁹	8,59	5,42	1,56	C ^γ H ₂ 1,40; 1,14 C ^γ H ₃ 0,89 C ^δ H ₃ 0,55 C ^γ H ₂ 2,35; 2,35 N ^ε H ₂ *
Gln ⁶⁰	8,36	4,81	2,13; 1,98	
Cys ⁶¹	9,42	5,58	3,74; 3,00	
Cys ⁶²	9,19	5,16	3,59; 3,40	
Ser ⁶³	8,91	4,99	4,16; 3,99	
Thr ⁶⁴	7,47	4,72	4,23	C ^γ H ₃ 1,23
Asp ⁶⁶	8,25	4,77	2,55; 2,24	
Asn ⁶⁷	9,77	3,96	2,85; 2,75	N ^ε H ₂ 7,05; 6,00
Cys ⁶⁸	7,48	4,64	3,66; 3,59	
Asn ⁶⁹	8,95	5,00	2,86; 2,08	N ^ε H ₂ 7,85; 7,02 C ^γ H ₂ 1,90; 1,75 C ^δ H ₂ 3,57; 3,37
Pro ⁷⁰				
Phe ⁷¹	7,75	4,16	2,88; 2,67	C ^δ H ₂ 7,11; 7,11 C ^ε H ₂ 7,31; 7,31 C ^δ H 7,28
Pro ⁷²				C ^γ H ₂ 1,63 C ^δ H ₂ 3,36; 2,37
Thr ⁷³	7,77	4,30	4,22	C ^γ H ₃ 1,23

* Сигналы N^εH₂-протонов Gln⁶⁰ в данных экспериментальных условиях не проявляются в ¹H-ЯМР-спектрах вследствие быстрого обмена с растворителем.

вания сигналов NH-протонов и слабого ЯЭО *d*-связи не были установлены для C-концевого пептида Thr⁷³ — Pro⁷⁷, что не позволило отнести сигналы остатков Arg^{74,76}, Lys⁷⁵ и Pro⁷⁷. Кроме того, остались неотнесенными сигналы некоторых протонов боковых цепей остатков Lys^{15,27,39,53}, Arg^{2,37} и Pro^{70,72} (табл. 1).

Сигналы от амидных N^εH₂-протонов боковых цепей остатков Asn^{19,67,69} соотношены с сигналами собственных C^βH₂-протонов с помощью ЯЭО (табл. 1). Сигналы четвертой пары N^εH₂-протонов боковой цепи остатка Gln⁶⁰ хорошо наблюдаются в NOESY-спектрах токсина 3 при 32° С. Повышение температуры приводит к возрастанию скорости обмена N^εH₂-протонов Gln⁶⁰ с растворителем, что не позволяет определить их химические сдвиги в спектрах ЯМР при 50° С.

Спиновая система Thr⁷³ была полностью идентифицирована в COSY-спектрах после отнесения сигналов других остатков треонина (табл. 1). Вследствие перекрывания сигналов C^αH Thr⁹ и C^αH₂ Pro¹⁰ с сигналами остатков Gly⁴⁴ и Gly⁵⁶ при всех использованных экспериментальных значениях pH и температуры *d*₁-связь Thr⁹ — Pro¹⁰ установить не удалось (рис. 9).

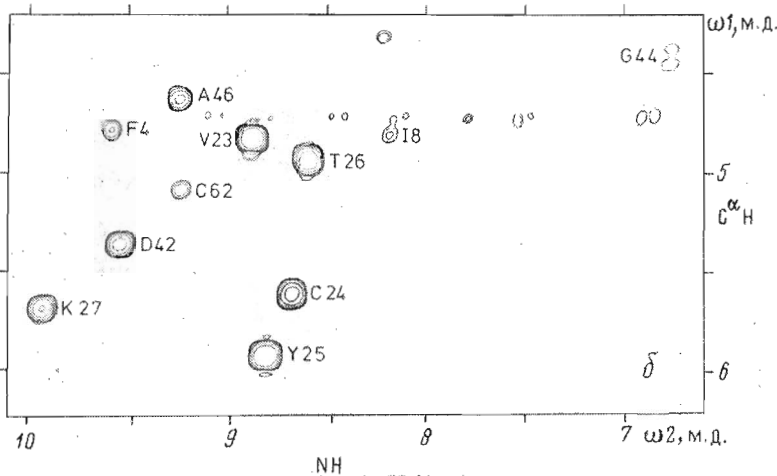
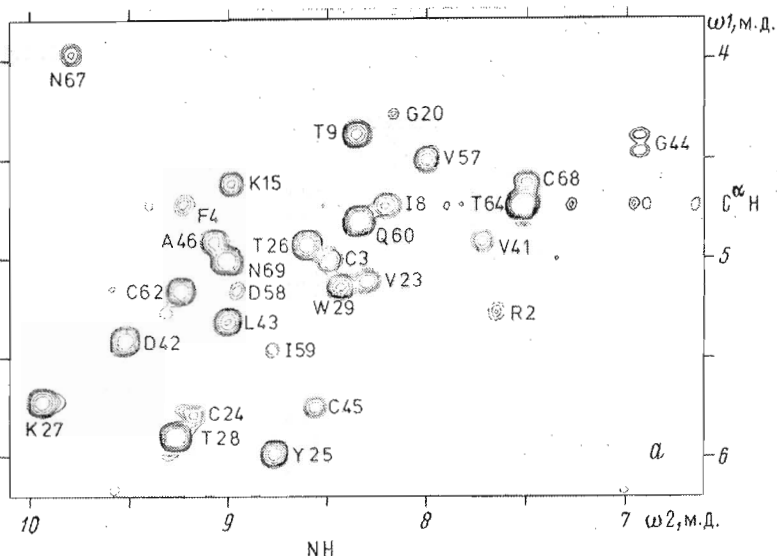


Рис. 8. Фрагменты COSY-спектров токсина 3 *N.n.siamensis* в $^2\text{H}_2\text{O}$ при 32°C и значениях pH 2,2 (а) и 7,5 (б). Каждый спектр получен в течение 26 ч для свежеприготовленных растворов токсина

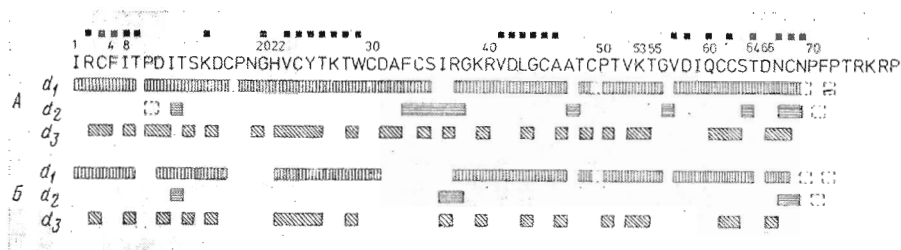


Рис. 9. Аминокислотная последовательность токсина 3 *N.n.siamensis* и карта d -связей между остатками для двух конформационных состояний А и Б, на основании которых получено отнесение сигналов в ^1H -ЯМР-спектрах. Участки, выделенные пунктиром, отвечают ЯЭО-взаимодействиям C^6H_2 -протонов остатков пролина с протонами соседних в аминокислотной последовательности остатков. Черными квадратами отмечены остатки, содержащие медленно обменивающиеся амидные протоны ($t_{1/2} > 20-100$ ч при pH 2,2 и 32°C). Нумерация аминокислотных остатков соответствует предложенной в работе [10] для токсинов змей

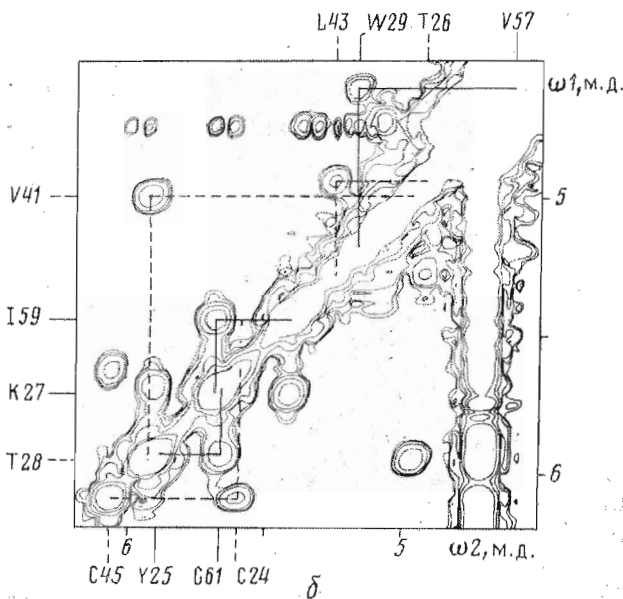
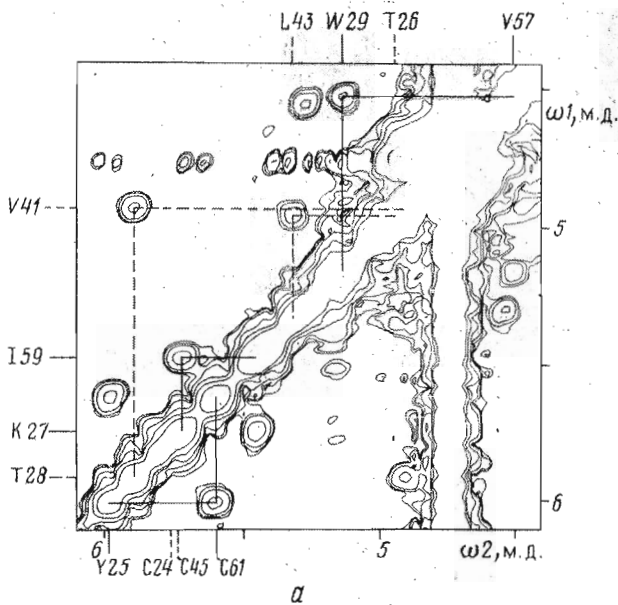


Рис. 10. Фрагменты NOESY-спектров (τ_m 100 мс) токсина 3 *N.n.siamensis* в $^2\text{H}_2\text{O}$ при 32°C и pH 2,2 (а) и 7,5 (б). ЯЭО-взаимодействия $\text{C}^\alpha\text{H} - \text{C}^\alpha\text{H}$ указаны для следующих аминокислотных остатков: Thr²⁹ - Val⁵⁷ (сплошная линия), Thr²⁸ - Val⁴¹ (пунктир), Thr²⁶ - Leu⁴³ (пунктир), Lys²⁷ - Ile⁵⁹ (сплошная линия), Thr²⁵ - Cys⁶¹ (сплошная линия) и Cys²⁴ - Cys⁴⁵ (пунктир). Химические сдвиги C^αH -протонов Cys²⁴ и Cys⁴⁵ близки при pH 2,2, и соответствующий ЯЭО-кросс-пик сливается с диагональными сигналами

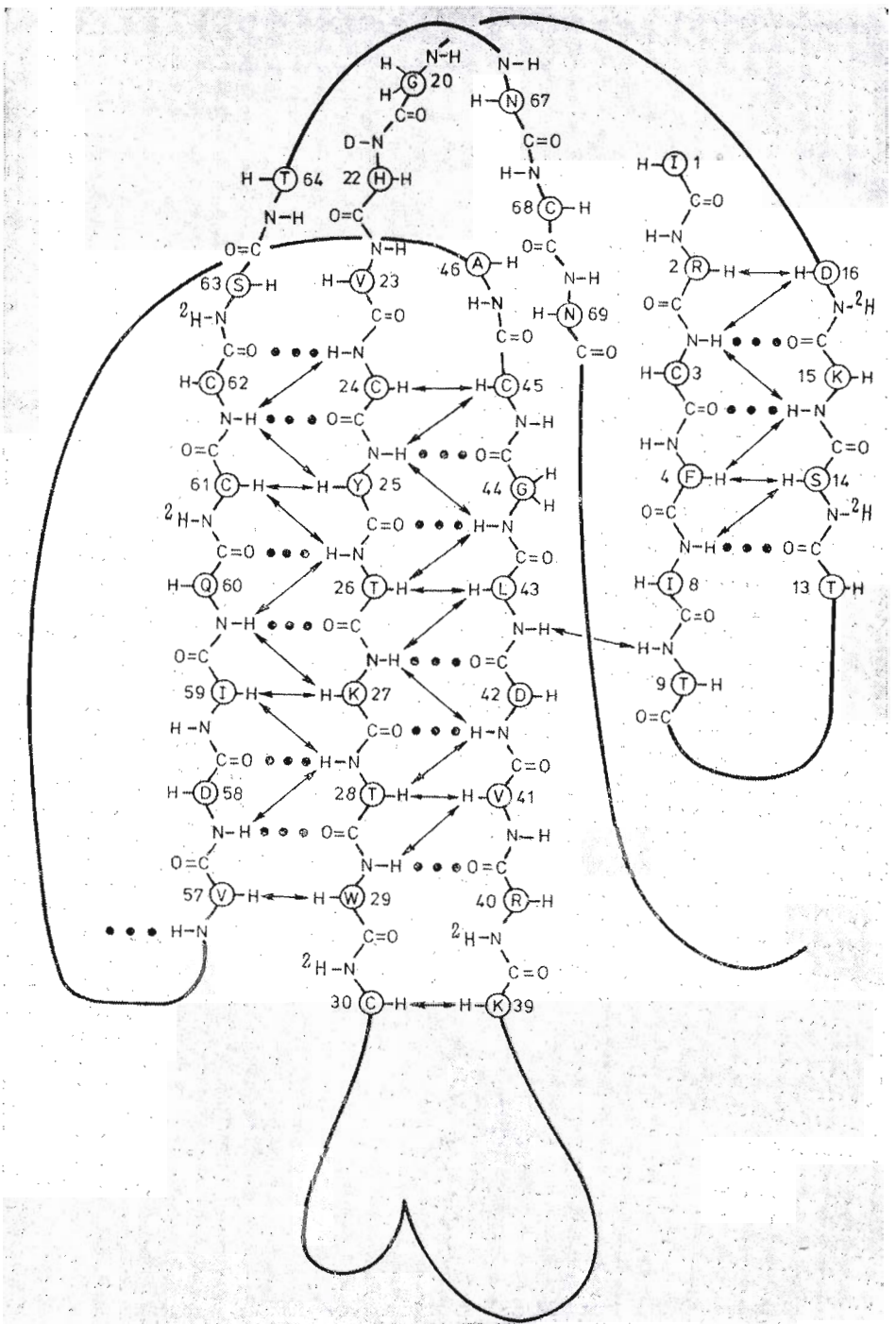


Рис. 11. Укладка основной цепи токсина 3 *N.n.siamensis* по данным ЯМР-спектроскопии. Приведены остатки, содержащие медленно обменивающиеся амидные протоны (рис. 8). Схематически указаны участки антипараллельной β -структуры. Стрелками обозначены идентифицированные в NOESY-спектрах ЯЭО-взаимодействия между протонами NH – NH (рис. 6) и $C^\alpha H - C^\alpha H$ (рис. 10, табл. 2) полипептидной цепи остатков, удаленных по аминокислотной последовательности. Точками обозначены внутримолекулярные водородные связи. Сплошной линией показаны остальные фрагменты полипептидной цепи

Протон-протонные контакты, идентифицированные в NOESY-спектрах между удаленными по аминокислотной последовательности остатками токсина 3 *N. n. siamensis* в двух конформационных состояниях

Протон		$\tau_{\text{M}}, \text{MC}$	Протон		Протон		$\tau_{\text{M}}, \text{MC}$	Протон	
C α H	Arg ²	100	C α H	Asp ¹⁶	NH	Thr ⁹	100	NH	Leu ⁴³
NH	Cys ³	100	NH	Lys ¹⁵	C α H	Thr ⁹	100	NH	Ile ¹²
		100	C α H	Asp ¹⁶	C β H	Thr ⁹	100	C α H	Asp ⁴²
C α H	Phe ⁴	100	NH	Lys ¹⁵	C γ H β	Thr ⁹	100	C α H	Asp ⁴²
C δ H ₂	Phe ⁴	200	C α H	Cys ³	C α H	His ²²	200 *	C β 'H	Pro ¹⁸
		100	C δ H ₃	Ile ⁸			100 *	C β 'H	Cys ²⁴
		100	C α H	Ser ¹⁴			200 *	C β 'H	Cys ⁴⁵
		100	C α H	Thr ¹³			100 *	C β H ₃	Ala ⁴⁶
		100	NH	Lys ¹⁵	C δ H	His ²²	100 *	C γ H ₃	Thr ⁴⁸
		100	C δ 'H ₃	Leu ⁴³			100 2*	C α 'H	Gly ²⁰
		100	C α H	Asn ⁶⁷			100 *	C β 'H	Cys ¹⁷
		100	C δ 'H	Pro ⁷⁰			200 *	C γ 'H ₃	Val ²³
C δ H ₂	Phe ⁴	100	C α H	Thr ¹³			200 *	C β 'H	Cys ²⁴
		100	C β 'H	Ser ¹⁴			100 *	C β 'H	Cys ⁴⁵
		100	C β 'H	Ser ¹⁴			100 *	C α H	Ala ⁴⁶
		100	C δ 'H ₃	Leu ⁴³			100 3*	C β H ₃	Ala ⁴⁶
		100	C α H	Asn ⁶⁷			100 *	C γ H ₃	Thr ⁴⁸
		100	C β 'H	Asn ⁶⁷	C γ 'H ₃	Val ²³	200	C α H	Cys ⁴⁵
		100	C β 'H	Asn ⁶⁷			100	NH	Ala ⁴⁶
		100	C δ 'H	Pro ⁷⁰			100	NH	Cys ⁴⁹
NH	Ile ⁸	100	C α H	Ser ¹⁴	C γ 'H ₃		100	NH	Cys ⁴⁹
C γ 'H ₃	Val ²³	100	C β 'H	Cys ⁶¹	C δ H ₂	Tyr ²⁵	100 *	C β 'H	Cys ⁶¹
		100	C β 'H	Cys ⁶¹	C δ H ₂	Tyr ²⁵	200 *	C γ 'H ₃	Val ²³
C γ 'H ₃		100	C β 'H	Cys ⁶¹			100 *	C α H	Cys ²⁴
		100	C β 'H	Cys ⁶¹			100	C α H	Thr ²⁶
NH	Cys ²⁴	100	NH	Cys ⁶²			100	C β 'H	Lys ²⁷
C α H	Cys ²⁴	100 4*	C α H	Cys ⁴⁵			100	C β 'H	Lys ²⁷
		200 4*	C β 'H	Cys ⁴⁵			100 *	C β 'H	Asp ⁴²
		200 4*	C β 'H	Cys ⁴⁵			100 *	C β 'H	Asp ⁴²
NH	Tyr ²⁵	100	NH	Gly ⁴⁴			100 *	C α H	Leu ⁴³
		100	C α H	Cys ⁴⁵			200 *	C α 'H	Gly ⁴⁴
C α H	Tyr ²⁵	100	C α H	Cys ⁶¹			100	C α 'H	Gly ⁴⁴
		200 *	C β 'H	Cys ⁶¹			200	NH	Cys ⁴⁵
C δ H ₂	Tyr ²⁵	200 *	C β H	Val ²³			200 *	C α H	Ala ⁴⁶
		200 *	C γ 'H ₃	Val ²³			100	C β H ₃	Ala ⁴⁶
		100	C γ 'H ₃	Val ²³			200 *	C β 'H	Cys ⁶¹
		100 *	C α H	Cys ²⁴	NH	Thr ²⁶	100	NH	Gln ⁶⁰
		100	NH	Thr ²⁶			100	C α H	Cys ⁶¹
		100	C α H	Thr ²⁶	C α H	Thr ²⁶	100	C α H	Leu ⁴³
		100	NH	Lys ²⁷			100	C δ 'H ₃	Leu ⁴³
		200	C α H	Lys ²⁷			100	NH	Gly ⁴⁴
		100	C β 'H	Lys ²⁷	C β H	Thr ²⁶	100	NH	Gln ⁶⁰
		100	C β 'H	Lys ²⁷			100	C β 'H	Gln ⁶⁰
		200	C α H	Leu ⁴³			100	C β 'H	Gln ⁶⁰
		100 *	C α H	Cys ⁴⁵			200	C γ '(C γ ')H	Gln ⁶⁰
		200	NH	Ala ⁴⁶	NH	Lys ²⁷	100	NH	Asp ⁴²
		100	C β H ₃	Ala ⁴⁶			100	C α H	Leu ⁴³
		100	C δ H ₃	Ile ⁵⁹	C α H	Lys ²⁷	100	C α H	Ile ⁵⁹
		100 *	C β 'H	Cys ⁶¹			100	C β ,C γ , δ H	Ile ⁵⁹
NH	Thr ²⁸	100	C γ 'H ₃	Val ⁵⁷	C α H	Trp ²⁹	100	C γ ,C γ 'H ₃	Val ⁵⁷
		100	NH	Asp ⁵⁸	C α H	Trp ²⁹	100	C α H	Val ⁴¹
		100	C α H	Ile ⁵⁹	C δ H ₃		100	C α H	Thr ²⁸
C α H	Thr ²⁸	100	C α H	Val ⁴¹			100	NH	Asp ⁴²
		100	NH	Asp ⁴²			100	C β '(C β ')H	Asp ⁴²
		100	C γ ,C γ 'H ₃	Val ⁴¹	C γ H	Trp ²⁹	100	C β '(C β ')H	Asp ⁴²
C γ H	Thr ²⁸	100	C α H	Val ⁴¹	C δ H ₃	Trp ²⁹	100	C β 'H	Cys ³⁰
NH	Trp ²⁹	100	NH	Arg ⁴⁰	C α H	Cys ³⁰	100	C α H	Lys ³⁹
		100	C α H	Val ⁴¹	C δ H ₂	Phe ³³	100	C β H ₃	Ala ³²
C α H	Trp ²⁹	100	C α H	Val ⁵⁷			100	C β 'H	Cys ³⁴
		200	C β H	Val ⁵⁷			100	C δ H ₃	Ile ³⁶
		100	C γ 'H ₃	Val ⁵⁷	C δ H ₂	Phe ³³	100	C β H ₃	Ala ³²
		200	C γ 'H ₃	Val ⁵⁷			200	C δ H ₃	Ile ³⁶
C β 'H	Trp ²⁹	100	C γ 'H ₃	Val ⁵⁷	C δ , δ 'H	Pro ⁵⁰	100	C δ H ₃	Ile ⁵⁹
C β 'H	Trp ²⁹	100	C γ 'H ₃	Val ⁵⁷	C δ H ₂	Phe ⁷¹	100	C γ H ₃	Thr ⁹

Протон	τ_M , мс	Протон	Протон	τ_M , мс	Протон
$C^{\delta}H$ Trp ²⁹	100	NH Cys ³⁰	$C^{\epsilon}H_2$ Phe ⁷⁴	100	$C^{\beta}, \gamma', \gamma''H$ Val ⁴¹
	100	$C^{\beta}H$ Cys ³⁰		100	$C^{\delta'}, \delta''H_3$ Leu ⁴³
	200	$C^{\alpha}, \gamma'H$ Val ⁵⁷		100	$C^{\gamma}H_3$ Thr ⁹
	100	$C^{\gamma'}H_3$ Val ⁵⁷		100	$C^{\gamma}H_3$ Ile ¹²
$C^{\epsilon}H$ Trp ²⁹	100	$C^{\alpha}H$ Thr ²⁸		100	$C^{\beta}, \gamma', \gamma''H$ Val ⁴¹
	200	$C^{\alpha}H$ Val ⁴¹		200	$C^{\delta'}, \delta''H_3$ Leu ⁴³

* ЯЭО обнаружен только в состоянии Б.

*² Проявляется для $C^{\delta}H$ -протона His²² только в состоянии А.

*³ В состоянии Б наблюдается только при τ_M 200 мс.

*⁴ При кислотных значениях рН химические сдвиги $C^{\alpha}H$ -протонов Cys²⁴ и Cys⁴⁵ близки (табл. 1, рис. 10а), что не позволяет идентифицировать данные кросс-пики в состоянии А.

Отнесению сигналов вдоль полипептидной цепи при значении рН 7,5 препятствует быстрый обмен ряда амидных протонов с растворителем, что не позволяет определить *d*-связи внутри пептидных фрагментов Asp¹¹ – Pro¹⁰, His²² – Pro¹⁸, Ser³⁵ – Ala³², Thr⁴⁸ – Ala⁴⁷, Val⁵⁷ – Gly⁵⁶ и Asp⁶⁶ – Thr⁶⁴. Идентификация спиновых систем алифатических протонов остатков His²² и Phe³³ проведена с помощью ЯЭО между ароматическими и $C^{\beta}H_2$ -протонами внутри остатков (рис. 2). Отнесение сигналов Ala³² при значении рН 7,5 выполнено ранее [15]. Сигналы $C^{\alpha}H_2$ -протонов Gly²⁰ идентифицированы в COSY-спектре токсина 3 после отнесения сигналов Gly^{38,44,56}. Трехспиновые системы алифатических протонов остатков Asn¹⁹, Cys³⁴ и Ser³⁵ были выделены в COSY-спектре, а затем отнесены к конкретному остатку в молекуле путем сравнения их химических сдвигов и проявляющейся мультиплетности сигналов при значениях рН 2,2; 3,3 и 7,5.

Ядерный эффект Оверхаузера. Главная особенность ядерного эффекта Оверхаузера, обнаруженного между соседними аминокислотными остатками токсина 3, – наличие большинства *d*₁ и *d*₃-связей и очень незначительного числа *d*₂-связей (рис. 9), что предполагает существование обширных β -структурных областей в молекуле [22, 23]. Для установления участков β -структуры методом ЯМР необходимо не только наличие *d*₁ и *d*₃-связей и идентификация медленно обменивающихся амидных протонов, но и проявление характерных ЯЭО-взаимодействий между противостоящими остатками в β -структурной конформации [23, 24]. Анализ NOESY-спектров токсина 3 выявил ряд таких ЯЭО-взаимодействий между протонами остатков, удаленных по аминокислотной последовательности (рис. 6, 10, 11, табл. 2). Это позволило охарактеризовать три участка антипараллельной β -структуры, содержащей пептидные фрагменты Cys²⁴ – Cys³⁰, Lys³⁹ – Cys⁴⁵ и Val⁵⁷ – Cys⁶² (рис. 11), что хорошо согласуется с результатами рентгеноструктурного анализа токсина 3 [3]. Кроме того, данные о ЯЭО (рис. 11, табл. 2) позволяют установить дополнительный участок антипараллельной β -структуры, образованный короткими пептидными фрагментами от Arg² до Ile⁸ и от Thr¹³ до Asp¹⁶.

Результаты конформационного ЯМР-анализа токсина 3 указывают на то, что медленный обмен амидных протонов остатков Arg², Phe⁴, Thr⁹, Val⁴¹, Leu⁴³, Cys⁴⁵ (рис. 8а, 11) может быть обусловлен их экранированием от контактов с растворителем боковыми цепями гидрофобных остатков (Phe⁴, Ile⁸, Val⁴¹, Leu⁴³) и С-концевым фрагментом длинного нейротоксина, который расположен под внешней поверхностью молекулы между первой и центральной петлями. Об этом свидетельствуют данные о сближенности ароматических протонов остатка Phe⁷¹ с протонами боковых цепей Thr⁹, Val⁴¹ и Leu⁴³ (рис. 12), а также Phe⁴ с Asn⁶⁷ и Pro⁷⁰ (табл. 2). Обнаружены также ЯЭО-взаимодействия между пептидными фрагментами центральной и первой петли: NH(Leu⁴³) – NH(Thr⁹), $C^{\delta}H_3$ (Leu⁴³) – ароматические протоны (Phe⁴), $C^{\alpha}H$ (Asp⁴²) – $C^{\beta}H$, $C^{\gamma}H_3$ (Thr⁹) (табл. 2). Однако полученные

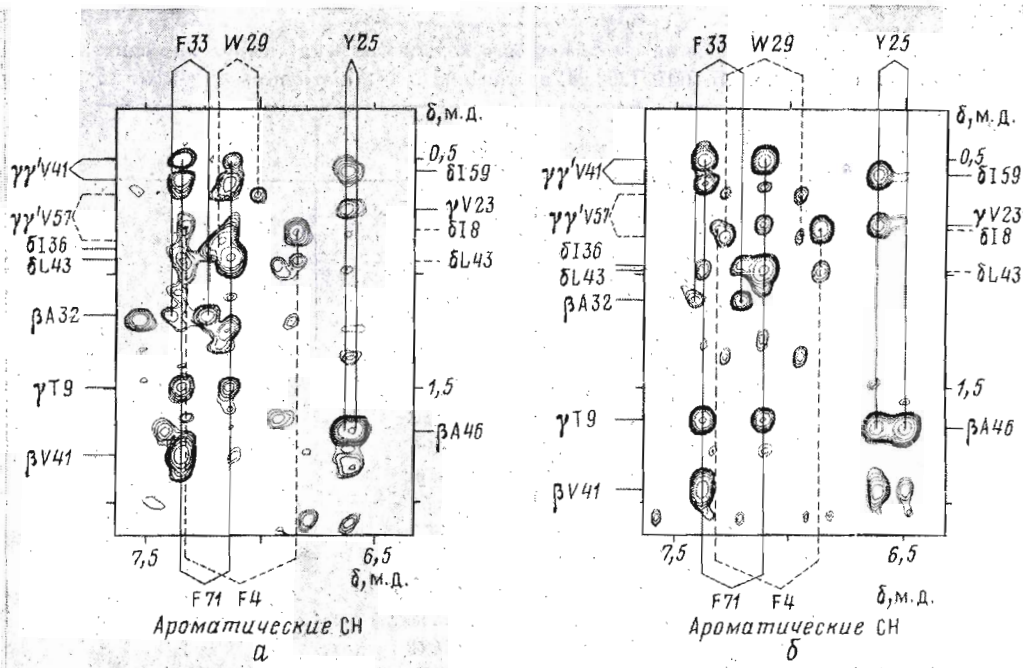


Рис. 12. Фрагменты NOESY-спектров (τ_m 100 мс) токсина 3 *N.n.siamensis* в $^2\text{H}_2\text{O}$ при 32°C и pH 2,2 (а) и 7,5 (б). ЯЭО-взаимодействия между ароматическими и метильными протонами указаны для следующих аминокислотных остатков: Phe⁴ – Ile⁸, Leu⁴³ (пунктир), Tyr²³ – Val²³, Ala⁴⁶, Ile³⁹ (сплошная линия), Trp²⁹ – Val⁵⁷ (пунктир), Phe³³ – Ala³², Ile³⁶ (сплошная линия), Phe⁷¹ – Thr⁹, Val⁴¹, Leu⁴³ (сплошная линия)

данные о ЯЭО между участками полипептидной цепи Phe⁴ – Thr⁹ и Asp⁴² – Leu⁴³ не позволяют сделать вывод о наличии антипараллельной β -структуры между центральной и первой петлями (рис. 11). d_2 -Связи обнаружены только в пептидных фрагментах, которые, согласно рентгеноструктурному анализу, образуют изгибы полипептидной цепи (рис. 9, 11). Эти пептидные фрагменты расположены главным образом на концах каждой из петель (остатки Pro¹⁰ – Thr¹³, Phe³³ – Gly³⁸, Gly⁵⁶ – Val⁵⁷ и Asn⁶⁷ – Asn⁶⁹).

Конформационные особенности токсина 3 по данным 2-D- ^1H -ЯМР-спектроскопии. Проведенное ранее исследование pH-зависимости химических сдвигов обнаружило ряд особенностей, связанных с изменением ионизационного состояния His²² [15]. Протонирование боковой цепи His²² вызывает в интервале значений pH 4–7 специфические эффекты на сигналах от ряда остатков (сдвиг, уширение или расщепление с изменением интенсивности), что свидетельствует о наличии конформационного перехода в молекуле токсина 3. Влияние ионизации His²² на химические сдвиги сигналов в ^1H -ЯМР-спектрах токсина 3 показано в табл. 3. Полученные в работе [15] данные свидетельствуют, что молекула длинного нейротоксина испытывает вблизи физиологических значений pH локальную конформационную перестройку, причем токсину 3 присущи два конформационно-устойчивых состояния: А (с протонированным имидазольным кольцом остатка His²²) и Б (с депротонированным имидазольным кольцом His²²).

Определение различий в пространственной организации молекулы для каждого из состояний основывалось на сравнительном анализе двумерных спектров ЯЭО. Обнаруженные в NOESY-спектрах (при τ_m 100 мс) ЯЭО-взаимодействия между протонами боковых цепей ряда остатков, удаленных по аминокислотной последовательности, при значениях pH 2,2 и 3,3 (состояние А) хорошо согласуются с внутримолекулярными расстояниями, оцененными из рентгеноструктурных координат атомов токсина 3 *N. n. siamensis*. Сравнение данных о d_1 -, d_2 - и d_3 -связях (рис. 9), характеризующих вторичную структуру молекулы при низких значениях pH

Влияние протонирования имидазольного кольца His²² на химические сдвиги сигналов в спектрах ¹H-ЯМР (300 МГц) токсина 3 *N. n. stamensis* (²H₂O, 32° С)

Остаток	Сигнал протона	δ при pH 7,5	Δδ *
His ²²	C ^α H	7,71	0,91 ^{2*}
Cys ⁴⁵	C ^α H	6,06	-0,28 ^{2*}
Ala ⁴⁶	C ^β H ₃	1,54	0,12 ^{2*}
Val ²³	C ^γ H ₃	0,89	0,02
	C ^{γ'} H ₃	0,76	-0,09 ^{2*}
Ile ¹	C ^γ H ₃	0,76	-0,08 ^{2*}
Phe ⁴	C ^α H ₂	6,87	-0,08 ^{3*}
Ile ⁸	C ^γ H ₃	1,10	0,02 ^{3*}
Lys ¹⁵	C ^α H ₂	2,93	0,02
Cys ²⁴	C ^α H	5,58	0,14 ^{3*}
Tyr ²⁵	C ^δ H ₂	6,65	-0,05 ^{3*}
	C ^ε H ₂	6,54	0,05 ^{3*}
Val ⁴¹	C ^γ H ₃	0,58	0,02
	C ^{γ''} H ₃	0,52	-0,02
Leu ⁴³	C ^α H	5,24	0,04
Val ⁵²	C ^γ H ₃	0,81	-0,02
	C ^{γ'} H ₃	0,72	-0,02
Ile ⁵⁹	C ^δ H ₃	0,56	-0,03 ^{3*}
Cys ⁶¹	C ^α H	5,65	-0,07 ^{3*}
Phe ⁷¹	C ^δ H ₂	7,32	-0,02

* Положительные значения Δδ соответствуют сдвигу в слабое поле при уменьшении pH.

^{2*} Сигнал расщепляется на две компоненты в интервале pH 5—6.

^{3*} Наблюдается сильное уширение сигнала в интервале pH 4,5—6,5.

(состояние А) и pH 7,5 (состояние В), свидетельствует о высокой конформационной стабильности основной цепи токсина 3. Единственным исключением является фрагмент Cys¹⁷—Pro¹⁸, для которого ЯЭО-взаимодействия между C^αH-протоном Cys¹⁷ и C^δH₂-протонами Pro¹⁸ наблюдаются только в состоянии А.

Сравнение данных о ЯЭО между протонами аминокислотных остатков, удаленных по цепи, также указывает на большое сходство конформаций токсина в состояниях А и В (рис. 9, табл. 2). Различие ЯЭО-контактов наблюдается только для ароматических протонов остатков His²² и Tyr²⁵ (рис. 13, 14, табл. 2). Анализ NOESY-спектров, полученных при τ_м 100 и 200 мс, свидетельствует о том, что при значении pH 7,5 имидазольное кольцо His²² находится внутри белковой глобулы (проявляет ЯЭО-взаимодействия с протонами гидрофобных боковых цепей остатков Cys^{17,24,45}, Pro¹⁸, Val²³, Ala⁴⁶, Thr⁴⁸), что объясняет снижение рK_а His²² до 4,7 [15]. В конформационном состоянии А (pH 2,2) C^αH-протон His²² вообще не проявляет ЯЭО-взаимодействий с окружением, а для C^δH-протона наблюдаются только ЯЭО с одним из C^αH-протонов Gly²⁰ и C^βH₃-группой Ala⁴⁶, отсутствовавшие при pH 7,5 (рис. 14, табл. 2). Это указывает на более высокую доступность имидазольного кольца His²² к растворителю в состоянии А, что обуславливает нормальное значение его рK_а 6,9 [15]. Полученные результаты хорошо согласуются с данными о кристаллической структуре токсина 3, подтверждающими удаленность (~8—12 Å) имидазольного кольца His²² от остатков Cys^{17,24,45}, Pro¹⁸, Val²³, Ala⁴⁶ и Thr⁴⁸ в конформационном состоянии А. Необходимо также отметить, что C^βH₂-протон His²² проявляет ЯЭО с собственными C^βH₂-протонами только в состоянии В (рис. 2). По данным работы [18], ЯЭО между C^βH- и C^δH-протонами остатка гистидина наблюдаются (при τ_м ≤ 100 мс) только в интервале значений угла χ²(C^β—C^γ) от -100 до +100°. Поэтому появление или исчезновение ЯЭО между C^αH- и C^βH₂-протонами His²² при переходе из одного конформацион-

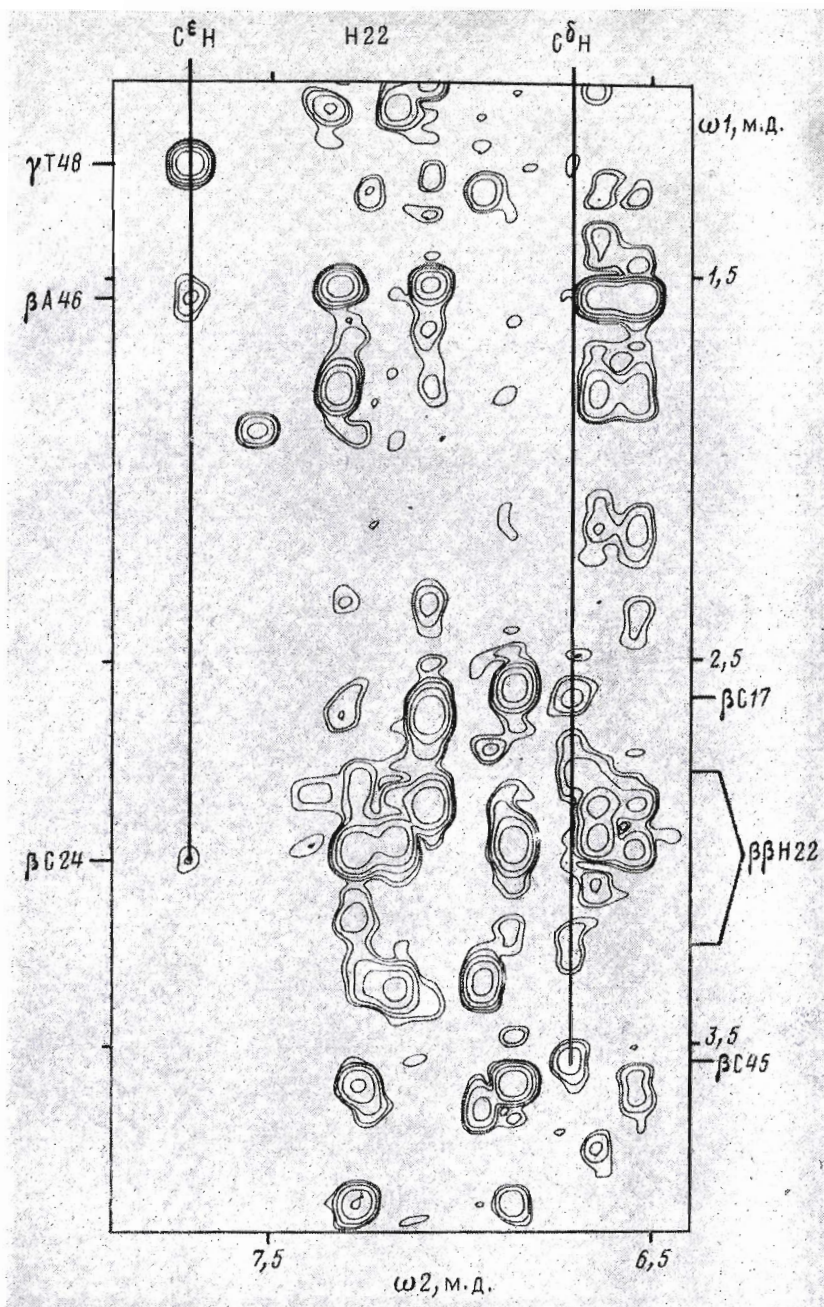


Рис. 13. Фрагмент NOESY-спектра (τ_m 100 мс) токсина 3 *N.n.siamensis* в $^2\text{H}_2\text{O}$ при pH 7,5 и 32° С. Отнесение ЯЭО-кросс-пиков ароматических протонов остатка His²² показано на полях контурной карты

ного состояния в другое определяется изменением ориентации имидазольного кольца His²².

Протомирование His²² сопровождается также изменением ориентации фенольного кольца Tug²⁵, что проявляется в исчезновении и ослаблении интенсивности ряда ЯЭО-взаимодействий ароматических протонов Tug²⁵ с пространственно сближенными протонами других аминокислотных остатков (рис. 14, табл. 2).

Ионизация имидазольного кольца His²² затрагивает большое число сигналов протонов, расположенных в различных областях молекулы токсина 3 (см. табл. 3 и работу [15]). Результаты настоящей работы позво-

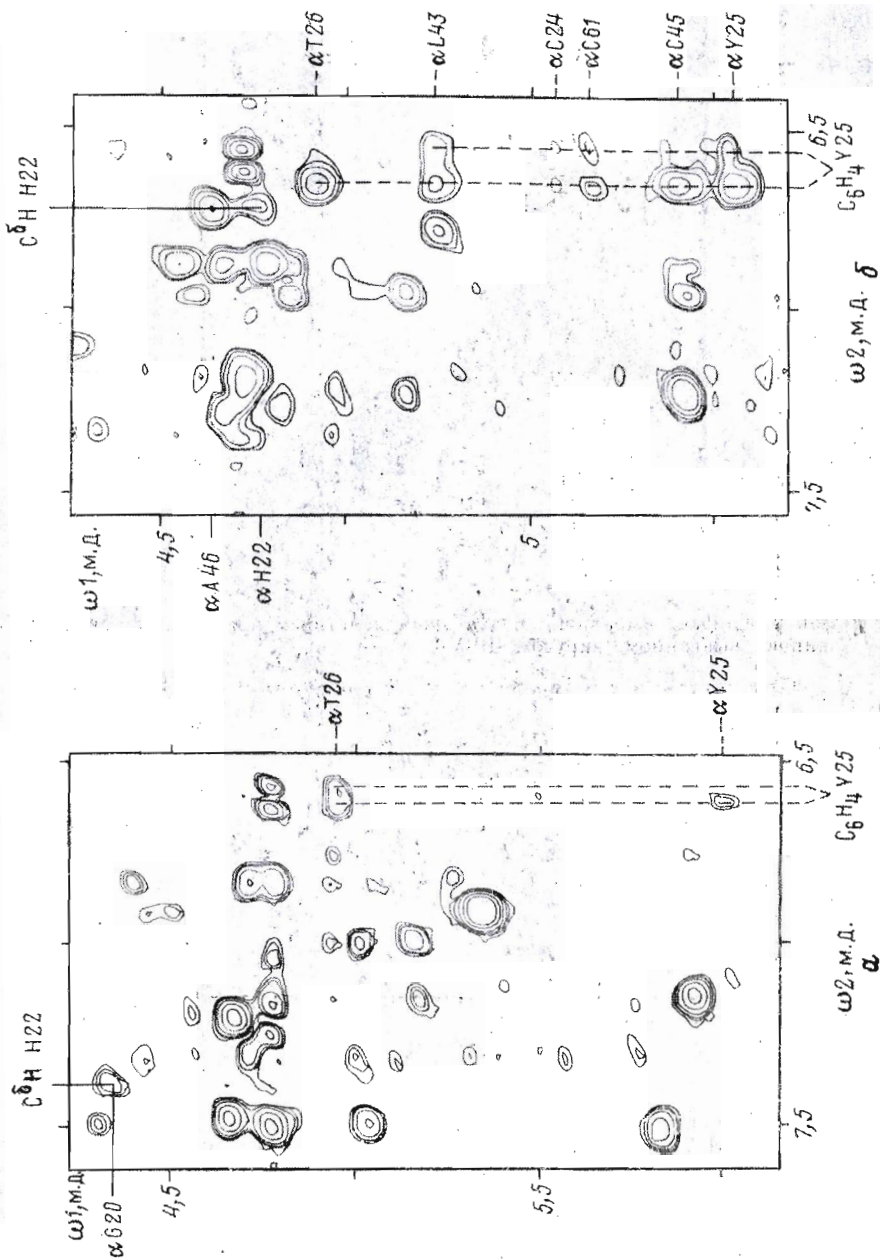


Рис. 14. Фрагменты NOESY-спектров (T_m 100 мс) токсина 3 *N.l.staemensis* в 2H_2O при 32° С и рН 2.2 (а) и 7.5 (б). Сплошной линией показано отчисление ЯЭО-кросс-пиков $С^δН$ -протона остатка His²². Пунктирными линиями отмечены ЯЭО-взаимодействия ароматических протонов Tyr²³.

ляют сделать вывод о локальном характере конформационного перехода $A \rightleftharpoons B$, который состоит только в изменении ориентации имидазольного кольца His²² при его ионизации. Это также подтверждается сохранением ряда обнаруженных ЯЭО-взаимодействий между протонами остатков, образующих микроокружение His²², при переходе из одного конформационного состояния молекулы в другое — например, между метильными протонами Val²³ и отдельными протонами остатков Cys⁴⁵, Ala⁴⁶, Cys⁴⁹, Cys⁶⁷ (табл. 2).

Необходимо также отметить следующую конформационную особенность токсина 3. Изменение ориентации имидазольного кольца His²² при его протонировании нарушает систему гидрофобных взаимодействий внутри локальной области молекулы, содержащей остатки Cys^{17,23,45}, Pro¹⁸, Gly²⁰, His²², Ala^{46,47}, Thr⁴⁸, повышая их доступность к растворителю. Это приводит к конформационной подвижности данной области молекулы, что проявляется в заметном уширении сигналов остатков Cys¹⁷, His²², Cys⁴⁵ и Ala⁴⁷ в состоянии А. При этом в корреляционных спектрах токсина 3 кросс-пики C^αH — C^βH-протонов для данных остатков имеют низкую интенсивность, что затрудняет идентификацию перечисленных выше спиновых систем.

Понижение температуры до 10°С замедляет обмен между конформационными состояниями токсина 3 и приводит к заметному сужению сигналов остатков His²², Cys^{17,45} и Ala⁴⁷.

Интересно, что, по данным рентгеноструктурного анализа, центром связывания тяжелого атома (Hg) является гидрофобная полость, образуемая между двумя симметрично расположенными молекулами токсина 3 таким образом, что она включает в себя остатки Cys¹⁷, Pro¹⁸, Asn¹⁹, Gly²⁰, Cys⁴⁵, Ala⁴⁶ и Ala⁴⁷ обеих молекул, причем атом ртути расположен на расстоянии $\leq 3,5$ Å от центра дисульфидной связи Cys¹⁷ — Cys⁴⁵ [3]. Результаты конформационного ЯМР-анализа свидетельствуют о том, что в состоянии В (рН 7,5) C^βH-протон имидазольного кольца His²² расположен на расстоянии ≤ 3 Å от C^βH-протонов остатков Cys¹⁷ и Cys⁴⁵ (рис. 13, 15), т. е. депротонированное имидазольное кольцо гистидинового остатка располагается приблизительно в том же самом месте, где, по данным рентгеноструктурного анализа, расположен атом ртути в кристаллической структуре.

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют дать детальное описание конформационных перестроек, происходящих в молекуле (рис. 15). При значениях рН $\geq 7,5$ имидазольное кольцо His²² находится в гидрофобном окружении. В результате протонирования (рН < 4) оно становится экспонированным в растворитель. Протонирование His²² сопровождается изменением ориентации боковых цепей Lys⁵³ [15] и Tyr²⁵, а также приводит к дестабилизации гидрофобной области молекулы, включающей в себя остатки His²², Ala⁴⁷ и соединенные дисульфидной связью остатки Cys¹⁷ и Cys⁴⁵. Последний вывод основан на том, что депротонирование имидазольного кольца His²² стабилизирует конформацию остатков Cys¹⁷ и Cys⁴⁵ (кросс-пики C^αH- и C^βH-протонов этих остатков хорошо проявляются в COSY- и NOESY-спектрах нейротоксина при рН 7,5) и вызывает изменение угла ψ остатка Cys⁴⁷, в результате чего ЯЭО между протонами C^αH Cys¹⁷ и C^βH₂ Pro¹⁸ (хорошо наблюдавшийся в NOESY-спектрах при рН 2,2 и 3,3) при рН 7,5 отсутствует.

Детальное исследование пространственной структуры и внутримолекулярной динамики нейротоксинов в растворе помогает понять механизмы токсин-рецепторных взаимодействий. Однако при интерпретации полученных данных о конформационных особенностях нейротоксинов нет единого мнения относительно их влияния на кинетические параметры связывания с рецептором.

В работах [25–28] проведено ЯМР-исследование пространственного строения трех нейротоксинов длинного типа, показавшее большое сходство их конформаций в растворе и кристалле. На основании сравнения скоростей дейтерообмена NH-протонов [25] сделан вывод о повышенной структурной жесткости длинных нейротоксинов по сравнению с короткими, что является, по мнению авторов [29, 30], определяющим фактором в

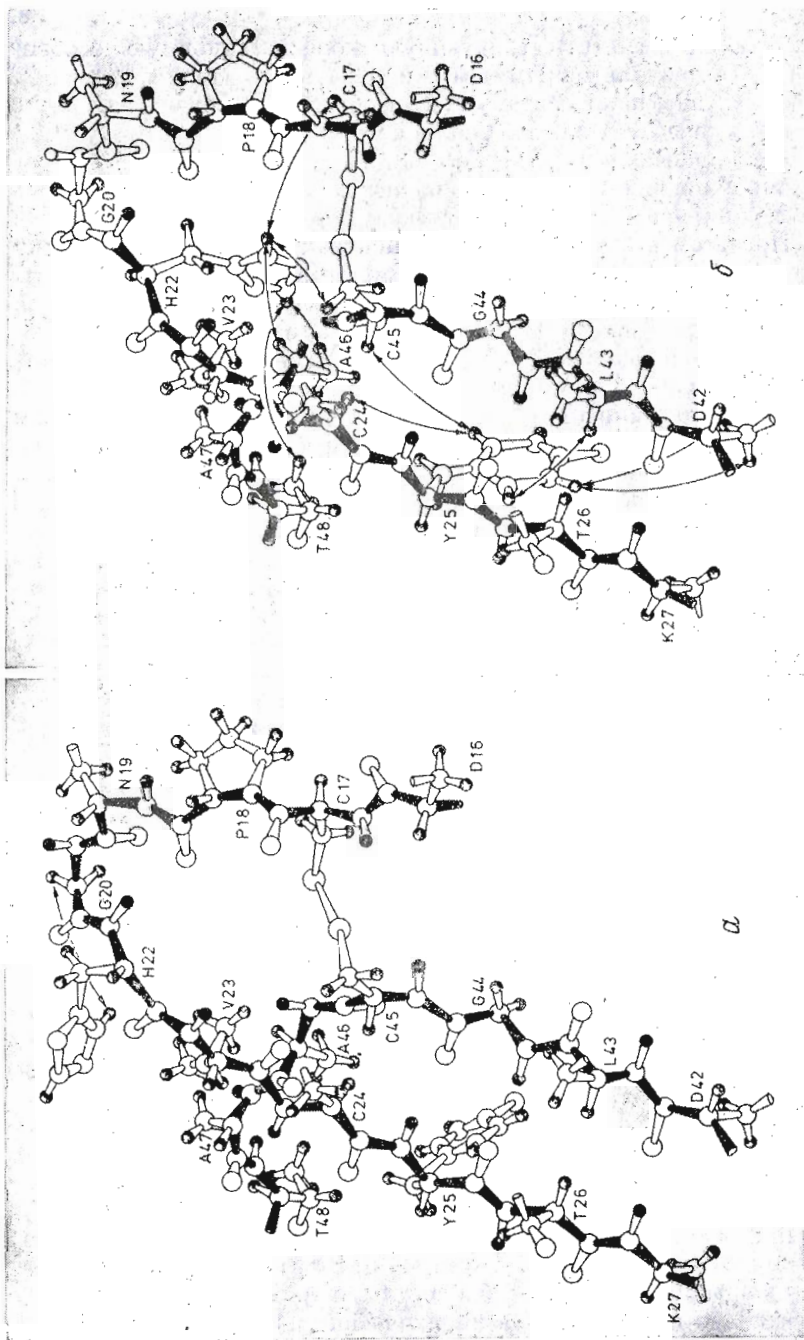


Рис. 15. Фрагмент пространственной структуры токсина 3 *N.n.siamensis* по данным ЯМР-спектроскопии (табл. 2) в конформационном состоянии А (рН < 4,0) (а) и В (рН \geq 7,5) (б). Стрелкой в состоянии А отмечен ЯЭО между С α -Н-протоном His²² и одним из С α -Н-протонов Gly²⁰, наблюдаемый только в этом состоянии (а). Стрелками в состоянии Б отмечены ЯЭО между ароматическими протонами His²² и Tyr²⁵ с пространственно сближенными протонами, наблюдаемые только в состоянии Б (б). Из-за быстрого обмена протонов NH Asp¹⁹ и Gly²⁰ конформацию основной цепи для фрагмента Рис. 18 — His²² установить не удалось (светлый участок основной цепи)

кинетических различиях при связывании с ацетилхолиновым рецептором. Этот вывод, однако, противоречит данным оптических методов [31] и более ранним ЯМР-исследованиям скоростей дейтерообмена для коротких нейротоксинов [32].

В работах [13, 15, 16, 33] обнаружена тенденция нейротоксинов длинного типа к конформационным перестройкам при изменении условий внешней среды. На наш взгляд, это свойство длинных нейротоксинов может объяснить более медленные скорости их ассоциации и диссоциации с рецептором, если предположить, что в процессе образования комплекса конформация длинного токсина приходит в соответствие с пространственным строением поверхности рецептора. С такой точкой зрения согласуется медленное связывание длинных нейротоксинов с ацетилхолиновым рецептором ($t_{1/2}=1-3$ мин [34]) и тот факт, что скорости ассоциации (но не диссоциации) быстро уменьшаются при температуре ниже 11°C [35].

Остаток His^{22} в длинных нейротоксинах не является ни инвариантным (он присутствует приблизительно у половины длинных нейротоксинов, для которых известны первичные структуры [36]), ни функционально важным остатком [37]. Однако его уникальное пространственное расположение влияет на конформационные особенности нейротоксина, которые в конечном счете могут определять кинетические параметры связывания с рецептором. Кроме того, для всех длинных нейротоксинов, содержащих остаток His^{22} , в положении 42 обнаружен остаток аспарагиновой кислоты вместо глутаминовой, присутствующей в остальных длинных нейротоксинах и во всех коротких нейротоксинах [36]. Для нейротоксинов, содержащих остаток His^{22} , которые были исследованы методами ЯМР и лазерной спектроскопии КР, отмечается более низкое значение pK_a Tyr^{25} по сравнению с инвариантным остатком тирозина в коротких нейротоксинах [15, 25], что обусловлено либо слабой водородной связью ароматического кольца Tyr^{25} с карбоксильной группой Asp^{42} [38], либо ее отсутствием [39]. Модификацию фенольного кольца для этой подгруппы длинных нейротоксинов можно проводить в сравнительно мягких условиях, причем полученные производные сохраняют высокую токсичность [40, 41].

Необходимо отметить, что, по данным ЯМР и рентгеноструктурного анализа, боковые цепи Tyr^{25} и Lys^{53} расположены на той части поверхности нейротоксина, которая, по всей вероятности, связывается с ацетилхолиновым рецептором [3, 13, 15]. Следовательно, их конформационная лабильность может позволить достигнуть лучшего конформационного соответствия взаимодействующих поверхностей длинного нейротоксина и рецептора. В коротких нейротоксинах конформация боковых цепей соответствующих остатков (например, Tyr^{25} и Lys^{47} в нейротоксине II *N. n. oxiana* [42]) мало подвержена влиянию внешней среды (температура и pH). Поэтому предполагаемая «подстройка» поверхности длинного нейротоксина при его взаимодействии с рецептором должна приводить к дополнительным затратам времени на образование комплекса токсин — рецептор по сравнению с коротким нейротоксином, но в результате такой комплекс оказывается более прочным. Это, в свою очередь, ведет к уменьшению скорости диссоциации комплекса, что подтверждается данными работ [43, 44].

Наряду с обсуждаемой подгруппой существует другая подгруппа «длинных» нейротоксинов — без His^{22} , но с Glu^{42} , образующей водородную связь с инвариантным остатком Tyr^{25} . Значение pK_a Tyr^{25} в таких нейротоксинах ≥ 12 , а модификация фенольного кольца Tyr^{25} , которая возможна только в присутствии денатурирующих реагентов, приводит к заметному снижению токсичности полученных производных [45]. Из всех нейротоксинов данной подгруппы методом ЯМР изучались α -бунгаротоксин *Bungarus multicinctus* [25] и нейротоксин I *N. n. oxiana* [13]. Для этих нейротоксинов отмечается конформационная подвижность в районе С-концевого фрагмента, содержащего остаток гистидина, что также может отражаться на кинетических особенностях связывания с рецептором.

Имеющиеся в настоящее время сведения о пространственной структуре нейротоксинов и ее динамике в растворе не позволяют, на наш взгляд, дать общую оценку выявленных конформационных особенностей длинных и коротких нейротоксинов в связи с их кинетическими различиями при образовании комплекса с рецептором. Вместе с тем повышенная конформационная лабильность поверхности связывания в длинных нейротоксинах может быть одним из основных факторов, определяющих их более медленную ассоциацию и диссоциацию в токсин-рецепторных взаимодействиях.

Экспериментальная часть

Токсин 3 *N. n. siamensis* предоставлен д-ром Е. Карлссоном (Упсала, Швеция). Для получения двумерных SECSY-, COSY- и NOESY-спектров использовались 7 мМ растворы токсина в $^2\text{H}_2\text{O}$ и 0,01 М растворы в H_2O (10% $^2\text{H}_2\text{O}$) при значениях pH 2,2; 3,3 и 7,5 и температурах 32 и 50° С. Для получения COSY- и NOESY-спектров с частично обменными на дейтерий амидными протонами использовались свежеприготовленные растворы нейротоксина в $^2\text{H}_2\text{O}$ после предварительного обмена лабильных протонов на дейтерий в течение 0,5 ч при значениях pH 2,2 и 7,5 и последующей лиофилизации.

Двумерные ^1H -ЯМР-спектры были получены на частоте 500 МГц на спектрометре типа WM-500 Bruker, оснащенном ЭВМ Aspect-2000.

Для получения 2-D-корреляционных (COSY) спектров использовалась следующая импульсная последовательность [46–48]:

$$(90^\circ - t_1 - 90^\circ - t_2)_n, \quad (1)$$

где t_1 и t_2 — соответственно периоды эволюции и регистрации сигнала. Эксперимент повторялся для серии из 512 эквидистантных значений t_1 от 0,1 до 51,2 мс с шагом 0,1 мс. Для достижения удовлетворительного соотношения сигнал/шум использовалось 80 накоплений (n) для каждого значения t_1 . Перед началом первого 90-градусного импульса спиновая система релаксировала в течение 1,2 с для достижения начального равновесного состояния.

Спин-эхо-корреляционные (SECSY) спектры получены с помощью импульсной последовательности [47, 49]:

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

для серии из 512 значений t_1 от 0,1 до 204,9 мс с шагом 0,2 мс. Остальные параметры накопления SECSY-спектров аналогичны описанным выше для COSY-спектров.

Для получения спектров ядерного эффекта Оверхаузера (NOESY) использовалась последовательность [50, 51]:

$$(90^\circ - t_1 - 90^\circ - \tau_M - 90^\circ - t_2)_n, \quad (3)$$

где τ_M — время смешивания компонентов ядерной намагниченности. Спектры получены для значений τ_M 100 и 200 мс. Остальные параметры накопления NOESY-спектров выбирались такими же, как для COSY-спектров.

Во всех 2-D-экспериментах использовалось квадратурное детектирование. Для устранения экспериментальных артефактов приведенные выше импульсные последовательности повторялись 16 раз с различными фазами неселективных 90-градусных импульсов для каждого значения t_1 [47, 49]. При проведении экспериментов в растворе H_2O сигнал растворителя насыщался селективным радиочастотным импульсом в течение всего эксперимента, за исключением времени регистрации сигнала t_2 [52].

Параметры преобразования Фурье двумерных спектров токсина 3 аналогичны описанным в работе [22].

Для измерения pH водных растворов токсина использовали pH-метр типа Orion Research 601 с комбинированным электродом Ingold 405 M3.

Приведенные в тексте и подписях к рисункам значения рН в растворе $^2\text{H}_2\text{O}$ соответствуют прямым показаниям рН-метра. Для изменения рН растворов токсина использовали 0,5 н. растворы KOH и HCl . Спектры снимали в 5-мм ампуле. Химические сдвиги сигналов в ^1H -ЯМР-спектрах измерены относительно внутреннего стандарта — натриевой соли 2,2-диметил-2-силапентаил-5-сульфоната с точностью $\pm 0,01$ м.д.

Авторы выражают благодарность д-ру Е. Карлссону (Уппсала, Швеция) за предоставление образца токсина *N. n. siamensis* и д-ру В. Сэйнгеру (Гёттинген, ФРГ) за предоставление таблицы рентгеноструктурных координат атомов токсина 3.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lee C. Y. In: Neuropoisons/Ed. Simpson L. L. N. Y.: Plenum Press, 1971, v. 1, p. 21–70.
2. Tu A. T. In: Venoms: chemistry and molecular biology. A Wiley-Intersci. Publ., 1977, chap. 17, p. 240–256.
3. Walkinshaw M. D., Saenger W., Maelicke A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, № 5, p. 2400–2404.
4. Kistler J., Stroud R. M., Klymkowsky M. W., Lalancette R. A., Fairclough R. H. Biophys. J., 1982, v. 37, № 1, p. 371–383.
5. Stroud R. M. In: Molecular stereodynamics/Ed. Sarma R. H. N. Y.: Adenine Press, 1982, v. 2, p. 55–73.
6. Low B. W., Preston H. S., Sato A., Rosen L. S., Searl J. E., Rudko A. D., Richardson J. S. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, № 9, p. 2991–2994.
7. Tsernoglou D., Petsko G. A. FEBS Lett., 1976, v. 68, № 1, p. 1–4.
8. Tsernoglou D., Petsko G. A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 74, № 3, p. 971–974.
9. Kimball M. R., Sato A., Richardson J., Rosen L. S., Low B. W. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1979, v. 88, № 5, p. 950–959.
10. Karlsson E. In: Snake venoms. Handbook of experimental pharmacology/Ed. Lee C. Y. Berlin (West): Springer Verlag, 1979, v. 52, chap. 5, p. 159–212.
11. Tsetlin V. I., Karlsson E., Arseniev A. S., Utkin Yu. N., Surin A. M., Pashkov V. S., Pluzhnikov K. A., Ivanov V. T., Bystrov V. F., Ovchinnikov Yu. A. FEBS Lett., 1979, v. 106, № 1, p. 47–52.
12. Tsetlin V. I., Karlsson E., Utkin Yu. N., Pluzhnikov K. A., Arseniev A. S., Surin A. M., Kondakov V. I., Bystrov V. F., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. Toxicon, 1982, v. 20, № 1, p. 83–93.
13. Bystrov V. F., Tsetlin V. I., Karlsson E., Pashkov V. S., Utkin Yu. N., Kondakov V. I., Pluzhnikov K. A., Arseniev A. S., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. In: Toxins as tools in neurochemistry/Eds Hucho F., Ovchinnikov Yu. A. B.-N. Y.: Walter de Gruyter, 1983, p. 193–233.
14. Chicheportiche R., Vincent J. P., Koreyan C., Schweitz H., Lazdunski M. Biochemistry, 1975, v. 14, № 10, p. 2081–2091.
15. Кондаков В. И., Арсеньев А. С., Уткин Ю. Н., Карлссон Е., Гуревич А. З., Цетлин В. И., Быстров В. Ф., Иванов В. Т. Биоорг. химия, 1984, т. 10, № 7, с. 869–890.
16. Hider R. C., Drake A. F., Inagaki F., Williams R. J. P., Endo T., Miyazawa T. J. Mol. Biol., 1982, v. 158, № 2, p. 275–291.
17. Wuthrich K., Wider G., Wagner G., Braun W. J. Mol. Biol., 1982, v. 155, № 3, p. 311–319.
18. Billeter M., Braun W., Wuthrich K. J. Mol. Biol., 1982, v. 155, № 3, p. 321–346.
19. Wagner G., Wuthrich K. J. Mol. Biol., 1982, v. 155, № 3, p. 346–366.
20. Wider G., Lee K. H., Wuthrich K. J. Mol. Biol., 1982, v. 155, № 3, p. 367–388.
21. Wuthrich K. Biopolymers, 1983, v. 22, № 1, p. 131–138.
22. Арсеньев А. С., Кондаков В. И., Майоров В. Н., Волкова Т. М., Гришин Е. В., Быстров В. Ф., Овчинников Ю. А. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 6, с. 768–793.
23. Wagner G., Wuthrich K. Eur. J. Biochem., 1981, v. 114, № 2, p. 375–384.
24. Арсеньев А. С., Кондаков В. И., Майоров В. Н., Быстров В. Ф., Овчинников Ю. А. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 12, с. 1667–1689.
25. Endo T., Inagaki F., Hayashi K., Miyazawa T. Eur. J. Biochem., 1981, v. 120, № 1, p. 117–124.
26. Inagaki F., Clayden N. J., Tamiya N., Williams R. J. P. Eur. J. Biochem., 1981, v. 120, № 2, p. 313–322.
27. Inagaki F., Clayden N. J., Williams R. J. P. Eur. J. Biochem., 1982, v. 123, № 1, p. 99–104.
28. Inagaki F., Clayden N. J., Williams R. J. P. Eur. J. Biochem., 1982, v. 123, № 1, p. 177–194.
29. Inagaki F., Miyazawa T., Williams R. J. P. Biosci. Rep., 1981, v. 1, p. 743–755.
30. Miyazawa T., Endo T., Inagaki F., Hayashi K., Tamiya N. Biopolymers, 1983, v. 22, № 1, p. 139–145.
31. Nabadryk-Viala E., Thierry C., Menez A., Tamiya N., Thierry J. M. Biochim. et biophys. acta, 1980, v. 626, № 2, p. 321–331.
32. Lauterwein J., Wuthrich K., Schweitz H., Vincent J.-P., Lazdunski J. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1977, v. 76, № 4, p. 1071–1078.

33. Endo T., Inagaki F., Hayashi K., Miyazawa T. Eur. J. Biochem., 1982, v. 122, № 2, p. 541-547.
34. Banks B. E. C., Miledi R., Shipolini R. A. Eur. J. Biochem., 1974, v. 45, № 2, p. 457-468.
35. Lester H. J. Gen. Physiol., 1971, v. 57, № 2, p. 255.
36. Dujton M. J., Hider R. C. CRC Critical Rev. Biochem., 1983, v. 14, № 2, p. 113-171.
37. Karlsson E., Eaker D. J. Formosan Med. Assoc., 1972, v. 71, № 6, p. 358-371.
38. Takamatsu T., Harada I., Shimanouchi T., Ohta M., Hayashi K. FEBS Lett., 1976, v. 72, № 2, p. 291-294.
39. Набиев И. Р., Плужников К. А., Траханов С. Д., Ефремов Е. С., Цетлин В. И. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 6, с. 836-846.
40. Ohta M., Hayashi K. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1974, v. 56, № 4, p. 931-987.
41. Karlsson E., Sundelin J. Toxicon, 1967, v. 14, № 4, p. 295-306.
42. Пашков В. С., Плужников К. А., Уткин Ю. Н., Хинче Р., Арсеньев А. С., Цетлин В. И., Иванов В. Т., Быстров В. Ф. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 9, с. 1181-1219.
43. Lee C. Y., Chang C. C., Chen Y. M. J. Formosan Med. Assoc., 1972, v. 71, № 6, p. 344-349.
44. Lee C. Y., Chen Y. M. In: Animal, plant and microbial toxins. Chemistry, pharmacology and immunology/Eds Ohsaka A., Hayashi K., Sawai Y. N. Y.: Plenum Press, 1976, v. 2, p. 193-204.
45. Chen Y.-H., Tai J.-C., Huang W.-J., Lai M.-Z., Hung M.-C., Yang J.-T. Biochemistry, 1982, v. 21, № 14, p. 2592-2600.
46. Aue W. P., Bartholdi E., Ernst R. R. J. Chem. Phys., 1976, v. 64, № 5, p. 2229-2246.
47. Nagayama K., Anil Kumar, Wuthrich K., Ernst R. R. J. Magn. Res., 1980, v. 40, № 2, p. 321-334.
48. Bax A., Freeman R. J. Magn. Res., 1981, v. 44, № 3, p. 542-561.
49. Nagayama K., Wuthrich K., Ernst R. R. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1979, v. 90, № 1, p. 305-311.
50. Jeener J., Meier B. H., Bachmann P., Ernst R. R. J. Chem. Phys., 1979, v. 71, № 11, p. 4546-4553.
51. Anil Kumar, Ernst R. R., Wuthrich K. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1980, v. 95, № 1, p. 1-6.
52. Anil Kumar, Wagner G., Ernst R. R., Wuthrich K. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1980, v. 96, № 3, p. 1156-1163.

Поступила в редакцию
4.VI.1984

2D NMR STUDY ON CONFORMATIONAL FEATURES OF TOXIN 3 *NAJA NAJA SIAMENSIS*

KONDAKOV V. I., ARSENEV A. S., PLUZHNIKOV K. A.,
TSETLIN V. I., BYSTROV V. F., IVANOV V. T.

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

The spatial structure of «long» toxin 3 *Naja naja siamensis* in solution has been studied by methods of two-dimensional (2D) ^1H NMR spectroscopy. The individual signal assignments for 67 out of 71 residues and analysis of nuclear Overhauser effects between distinct protons of the molecule allowed the comparison of the toxin 3 conformations at different pH values and temperatures. It was shown that the deprotonated imidazole ring of His²² residue (at pH \geq 7.5) is surrounded by the side chains of Cys¹⁷, Pro¹⁸, Val²³, Cys²⁴, Cys⁴⁵, Ala⁴⁶ and Thr⁴⁸ residues. On the contrary, the protonated imidazole ring of His²² (at pH $<$ 4.0) is exposed into solvent. Ionization of His²² is accompanied by a change in the Tyr²⁵ aromatic ring orientation and affects the conformational mobility of the Cys¹⁷, His²², Cys⁴⁵ and Ala⁴⁷ side chains. The revealed conformational features of toxin 3 in solution are discussed in connection with the differences between «long» and «short» neurotoxins in the kinetics of their binding to acetylcholine receptor.