



УДК 577.322.5:591.145.2-546:543.422.25

СТРОЕНИЕ НЕЙРОТОКСИНА M_9 *BUTHUS EUPEUS*
В РАСТВОРЕ ПО ДАННЫМ СПЕКТРОСКОПИИ 1H -ЯМРПаииков В. С., Хоанг Н. А., Майоров В. Н.,
Быстров В. Ф.Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Методами 2D- 1H -ЯМР-спектроскопии определено пространственное строение основной цепи доминирующего в физиологических условиях конформера нейротоксина M_9 (66 аминокислотных остатков), выделенного из яда среднеазиатского скорпиона *Buthus eupeus*. В этом конформере основная полипептидная цепь образует правую α -спираль (остатки 22–31) и антипараллельную β -структуру (остатки 1–5, 46–52, 35–40), все пять связей Xxx-Pro имеют *транс*-конфигурацию. Сравнение со строением токсина ν -3 *Centruroides sculpturatus* в кристалле и «короткого» инсекто-токсина I_5A *Buthus eupeus* в растворе показало близкое сходство укладки основной цепи в первом случае. Во втором случае сходство заключается в типах и взаимном расположении элементов регулярных вторичных структур.

Скорпионовые нейротоксины — большая группа белков, состоящих из 60–80 аминокислотных остатков и содержащих четыре дисульфидные связи. Эти соединения, вызывающие функциональные изменения мембраны нервного волокна, имеют ограниченную гомологию первичных структур. При попарном сравнении нейротоксинов из яда одного и того же вида скорпионов гомология достигает 60–70%, при сравнении нейротоксинов из разных видов скорпионов гомология существенно ниже [1–4]. К настоящему времени пространственное строение установлено рентгеноструктурным анализом лишь для одного скорпионового токсина (ν -3 *Centruroides sculpturatus*), полученного кристаллизацией из органического растворителя, т. е. при нефизиологических условиях [5, 6]. О конформации скорпионовых нейротоксинов в растворе пока известно очень мало: в работе [7] указано, что спектры ЯМР не противоречат рентгеноструктурным данным для токсина ν -3; в работах [7–10] обнаружено сходство локального окружения консервативного остатка триптофана в ряду нескольких нейротоксинов, отмечена возможность существования β -структурных участков и показано, что скорпионовые токсины имеют различную конформационную лабильность.

В данной статье приведены результаты изучения пространственного строения нейротоксина M_9 *Buthus eupeus* (66 аминокислотных остатков, рис. 1) методами 1D- и 2D- 1H -ЯМР-спектроскопии. Установленное на основании этих данных пространственное строение основной полипептидной цепи токсина сопоставлено с конформацией гомологичного токсина ν -3 *C. sculpturatus* (65 аминокислотных остатков) в кристалле [5, 6] и строением «короткого» инсектотоксина I_5A *B. eupeus* (35 аминокислотных остатков) в растворе [1, 11–14]. Все три названных выше токсина имеют по четыре дисульфидные связи.

Влияние pH и температуры на конформационные состояния нейротоксина M_9 в растворе. Из-за ограниченной растворимости M_9 в интервале pH 5–10 при изучении спектров 1D- 1H -ЯМР удалось определить лишь интервал возможных значений pK_a имидазольных колец остатков His¹⁰ и His⁶⁶ ($6,2 < pK_a < 7,2$). Сигналы от ароматических протонов СН указывают на существование в кислой среде двух медленно обменивающихся конформационных форм токсина (рис. 2). Наиболее наглядно конформационная гетерогенность проявляется на сигналах от протонов C2-H остатков His¹⁰ и His⁶⁶, которые представлены двумя интенсивными и двумя слабыми

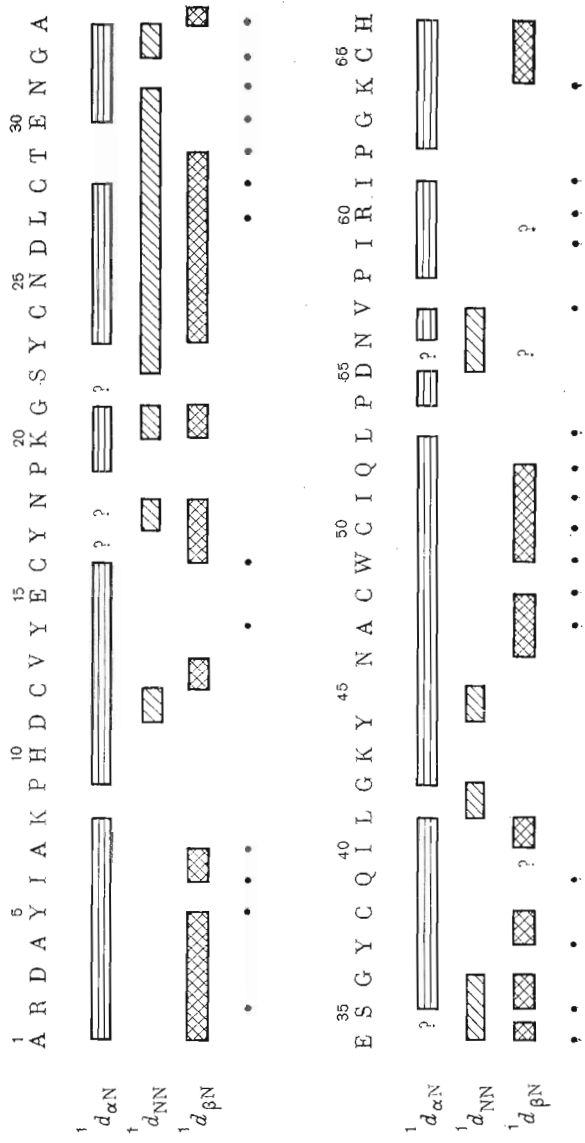


Рис. 1. Первичная структура нейротоксина *M₃ B. thaus* *viridis* [2] в однобуквенном коде. Прямоугольниками обозначены ЯЭО-контакты между протонами соседних аминокислотных остатков (см. текст). Знаком ? отмечены положения, в которых интерпретация ЯЭО не является однозначной. Зачеркнутыми кружками обозначены аминокислотные остатки, у которых водороды пептидных групп NH медленно обмениваются с ²H₂O

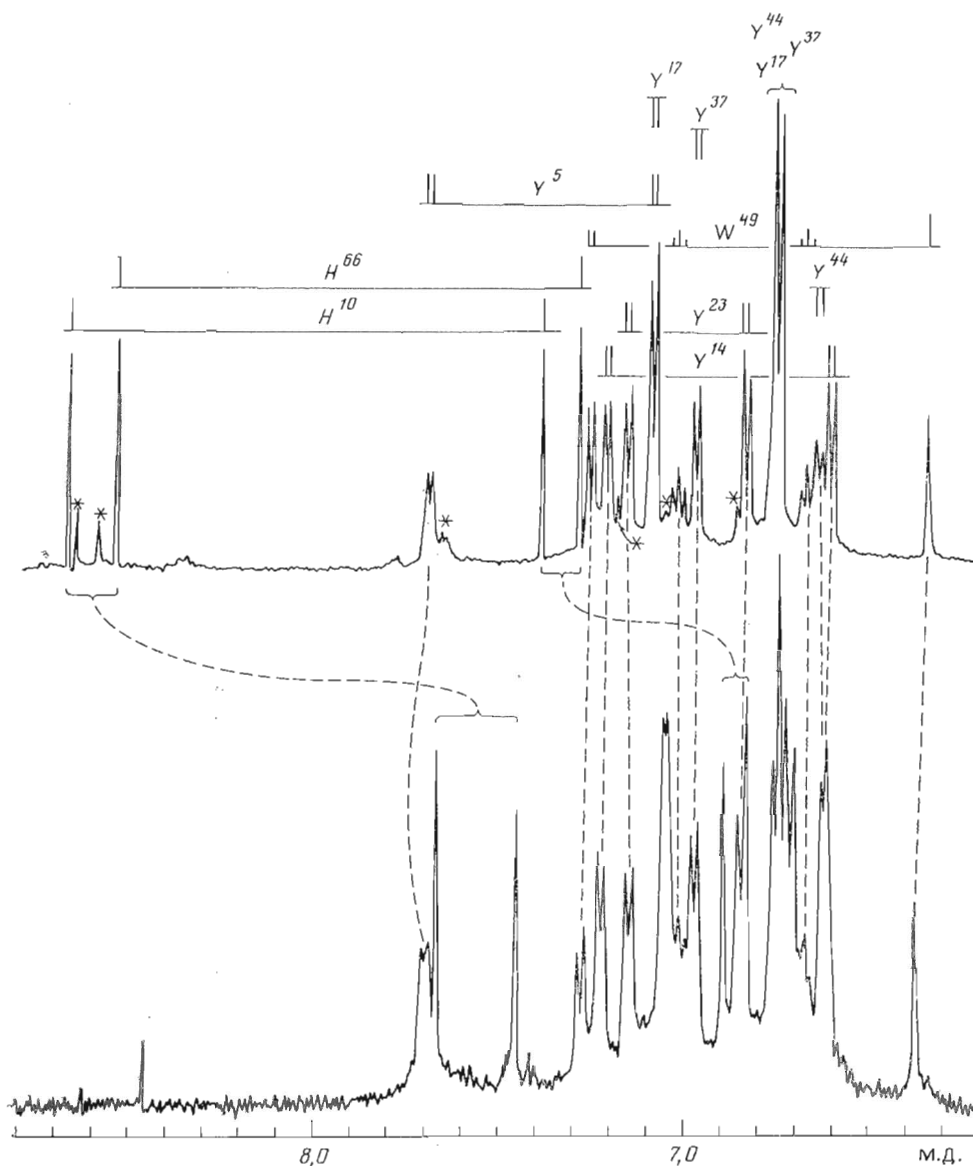


Рис. 2. Сигналы от ароматических протонов СН в спектре $1D-^1H-NMR$ нейротоксина M_9 при $32^\circ C$, рН 2,6 (вверху) и рН 10,0 (внизу). Звездочкой обозначены сигналы от минорного конформера. Положение сигналов индивидуальных протонов доминирующего конформера при рН 2,6 показано над спектром вертикальными линиями. Штриховыми линиями соединены эквивалентные сигналы доминирующего конформера в приведенных спектрах

синглетными пиками. Максимальная разность резонансных частот этих сигналов в доминирующем и минорном компонентах позволяет оценить верхний предел скорости интерконверсии конформеров ($k_{oc} \ll 15 \text{ c}^{-1}$), что указывает на высокий энергетический барьер конформационного перехода. Изменение населенностей конформационных форм под влиянием рН или температуры (рис. 3) имеет обратимый характер. Судя по рН-зависимости, появление конформационного равновесия вызвано протонированием одной или нескольких карбоксильных групп ($pK_a \approx 2$). В щелочной среде в спектре ^1H-NMR M_9 представлены сигналы лишь от одного конформера (рис. 2).

Пространственное строение полипептидной цепи доминирующего при физиологических условиях конформера токсина M_9 по данным спектроскопии $2D-^1H-NMR$. Спектры COSY и NOESY токсина M_9 сняты в усло-

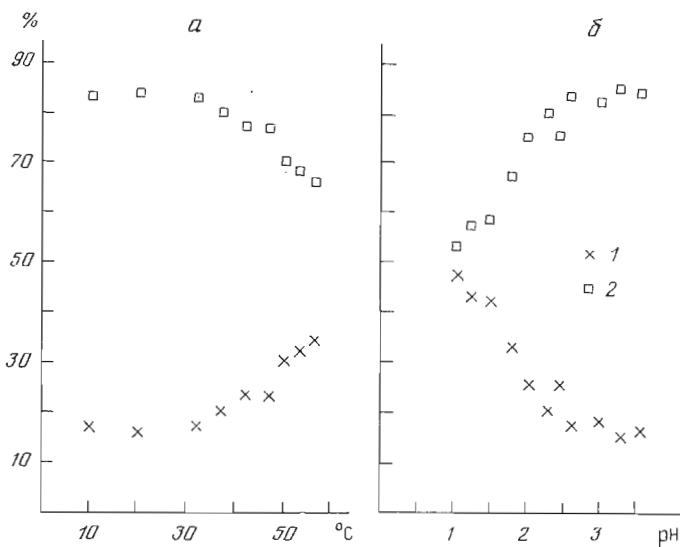


Рис. 3. Зависимость относительных населенностей минорного (1) и доминирующего (2) конформеров токсина M_9 от температуры при pH 2,6 (а) и от pH при 32° С (б). Зависимость получена из соотношения интенсивностей сигналов от протонов C2-N His¹⁹ и His⁶⁶

виях (pH 2,6–2,9; 30° С), когда преобладает форма, существующая при физиологических pH. Сигналы от минорной формы (<20%) практически не проявляются в этих спектрах. Совместным анализом спектров COSY и NOESY выделены и отнесены к положению в первичной структуре сигналы от большинства протонов доминирующей формы токсина M_9 . Не были идентифицированы лишь сигналы от быстро обменивающихся с растворителем водородов N-концевой аминогруппы, имидазольных колец и гидроксильных групп, а также сигналы от некоторых протонов боковых цепей, расположенных в сильно перекрытых областях спектров или вблизи от интенсивных диагональных пиков. Подробное описание отнесения сигналов токсина M_9 будет приведено в одной из следующих публикаций.

При $\tau_m=0,2$ с в спектрах NOESY небольших белков обычно проявляются кросс-пики, отвечающие ядерному эффекту Оверхаузера (ЯЭО) между протонами, находящимися на расстоянии менее 4 Å [15, 16]. В процессе анализа спектров NOESY токсина M_9 идентифицировано около 1000 таких кросс-пиков, принадлежащих протонам одного и того же остатка, соседних и удаленных по первичной структуре аминокислотных остатков. Эта информация положена в основу анализа пространственного строения токсина M_9 в растворе.

Все пять связей Xxx-Pro в токсине M_9 имеют *транс*-конфигурацию, поскольку во всех пяти случаях наблюдается сближенность (ЯЭО-контакт) протонов C^βH₂ пролинового остатка и C^αH остатка Xxx [11, 13, 17].

α_R -Спиральный участок в структуре токсина M_9 (остатки 22–31, рис. 4) зафиксирован по характерной (см. [11, 13, 17]) последовательности ЯЭО-контактов между протонами пептидных NH-групп соседних остатков i и $i+1$ ($^1d_{NN}$, рис. 1), между протонами C^αH и C^βH остатков i и $i+3$ ($^3d_{\alpha\beta}$, рис. 4), между протонами C^αH и NH остатков i и $i+3$ ($^3d_{\alpha N}$, рис. 4), а также по низким значениям констант спин-спинового взаимодействия $^3J(\text{H-NC}^\alpha\text{-H}) < 6$ Гц для остатков 23–30 [18, 19] и медленной скорости дейтерообмена водородов пептидных групп NH остатков 27–31 ($k_{\text{об}} < 6 \cdot 10^{-6}$ с, pH 2,5; 30° С). На концах правой спирали находятся остатки глицина (Gly²¹ и Gly³²), которые, по-видимому, и способствуют прерыванию этой регулярной структуры.

Выделена также β -структура, состоящая из трех ветвей (рис. 5): 1) остатки 1–5, 2) остатки 46–52, 3) остатки 35–40. Ее признаками в спектрах ЯМР [11, 13, 17] служат ЯЭО-контакты между протонами C^αH и NH соседних i и $i+1$ остатков ($^1d_{\alpha N}$, рис. 1), свидетельствующие о раз-

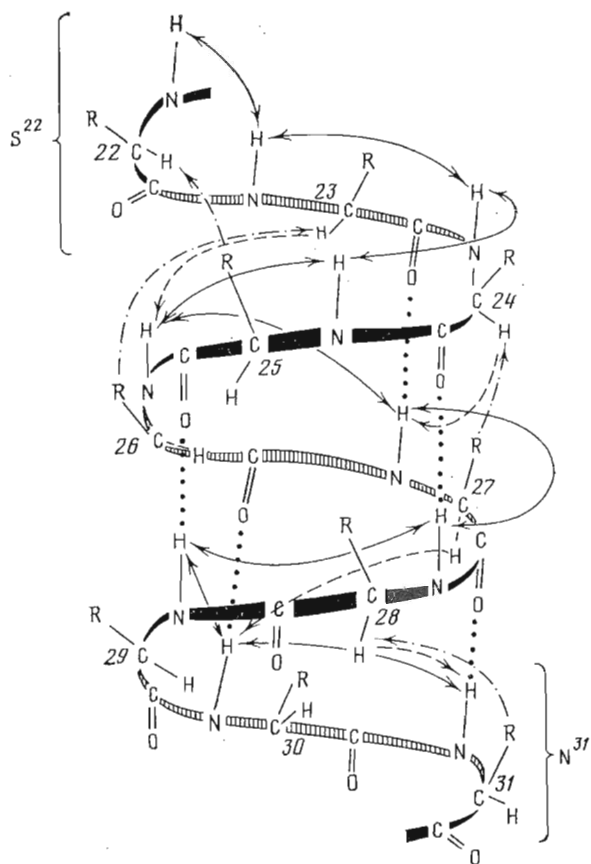


Рис. 4. α_R -Спиральная структура (участок полипептидной цепи Ser²² — Asn³¹) в нейротоксине M₉ и экспериментальные данные, использованные для ее обнаружения. Сплошной, штриховой и штрихпунктирной стрелками обозначены соответственно ЯЭО-контакты: $^1d_{NN}$, $^3d_{\alpha N}$, $^3d_{\alpha B}$ (см. текст). Пунктиром обозначены водородные связи между аминокислотными остатками спирали; участвующие в них водороды пептидных групп NH медленно обмениваются с $^2\text{H}_2\text{O}$. Цифрами обозначены C $^\alpha$ -атомы соответствующих аминокислотных остатков

вернутой конформации основной полипептидной цепи, и относительно высокие значения $^3J(\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H})$ [18, 19]. Однако основным доказательством наличия β -структуры [17, 20, 21] являются ЯЭО-контакты между протонами, принадлежащими разным ветвям β -структуры (рис. 5), и медленный дейтерообмен пептидных групп NH ($k_{\text{об}} < 6 \cdot 10^{-6}$ с), которые должны участвовать во внутримолекулярных водородных связях в составе β -структуры (рис. 1) [17, 20, 21].

Остальные фрагменты молекулы M₉ не образуют регулярных вторичных структур, но, исходя из значительного числа медленно обменивающихся пептидных групп NH, наличия ряда высоких значений констант спин-спинового взаимодействия $^3J(\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H})$ и присутствия пяти остатков пролина, также имеют достаточно фиксированное состояние.

Взаимное расположение регулярных вторичных структур (α_R -спирали и β -структуры) и остальных фрагментов достаточно надежно и однозначно определено учетом ограничений, накладываемых на молекулу токсина ковалентными дисульфидными связями и ЯЭО-контактами между удаленными по первичной структуре протонами: C $^\alpha\text{H}$ Ala⁷ и C $^\alpha\text{H}$ Val¹³, C $^\alpha\text{H}$ Ile⁶ и C $^\alpha\text{H}$ Ile⁵⁹, NH Cys¹⁶ и C $^\alpha\text{H}$ Ala⁴⁷, NH или C $^\alpha\text{H}$ Arg⁶⁰ и C $^\beta\text{H}_3$ Ala⁷, NH His¹⁰ и C $^\alpha\text{H}$ His⁶⁶, C $^\delta\text{H}_3$ Leu⁵³ и C $^\gamma\text{H}_3$ Val⁵⁷ и еще многими другими. Так, спиральный участок в молекуле M₉ заканчивается реверсивным поворотом (остатки 31–35), который в свою очередь переходит в одну из ветвей β -структуры. Положение α -спирали относительно β -структуры фикси-

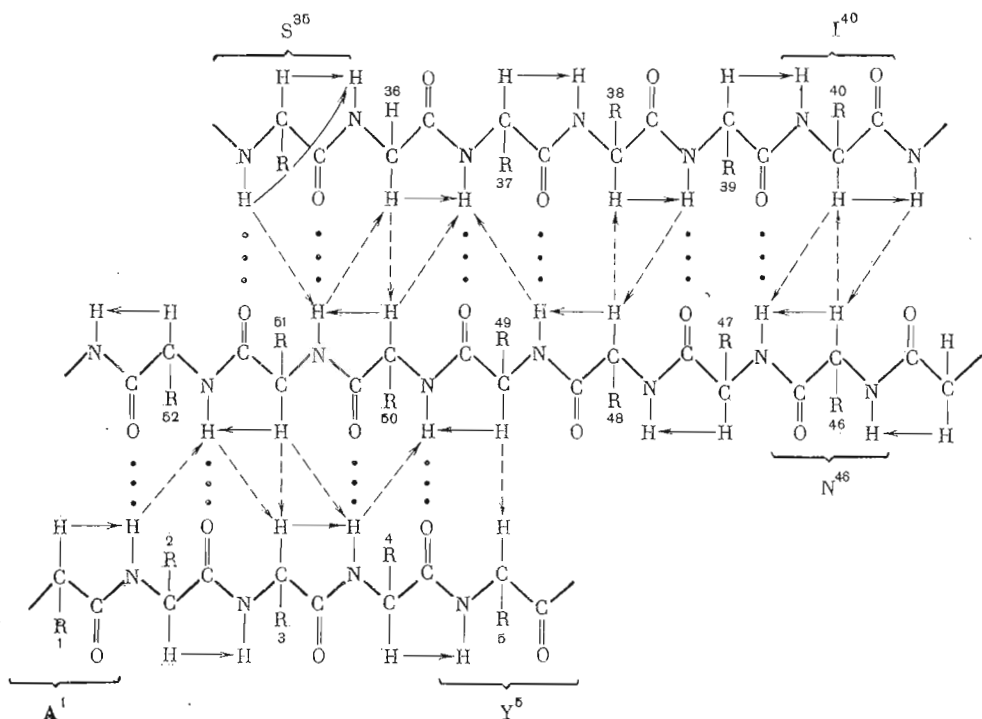


Рис. 5. Антипараллельная β -структура (участки полипептидной цепи Ala¹ — Tyr⁵, Asn⁴⁶ — Gln⁵², Ser³⁵ — Ile⁴⁰) нейротоксина M₃ и экспериментальные данные, использованные для ее выявления. Сплошной и штриховой стрелками обозначены соответственно ЯЭО-контакты между протонами соседних по первичной структуре аминокислотных остатков и ЯЭО-контакты между протонами соседних ветвей β -структуры. Три точки обозначены водородные связи между аминокислотными остатками соседних ветвей β -структуры, участвующие в них водороды амидных групп NH медленно обмениваются с ²H₂O (исключение составляет лишь водород NH-группы Ala⁴, имеющий более высокий темп обмена, вероятно, вследствие влияния положительного заряда пространственно сближенной с ним гуанидиновой группы Arg²). Цифрами обозначены C ^{α} -атомы соответствующих аминокислотных остатков

ровано двумя дисульфидными связями. Помимо реверсивного поворота, связывающего α -спираль с одной из ветвей β -структуры, изменение направления основной полипептидной цепи происходит в районе остатков 9–10, 19–20, 53–57, 60–61. Изгиб полипептидной цепи, вероятно, также происходит в районе остатков Pro⁶² и Gly⁶³. В районе остатков 41–45 полипептидная цепь образует петлю, которая соединяет две ветви антипараллельной β -структуры. Экспериментальные данные позволяют уточнить природу одного из изгибов полипептидной цепи (остатки 54–57). О близости конформации этого изгиба к стандартной структуре β -изгиба типа I свидетельствуют ЯЭО-контакты между пептидными протонами NH [17] остатков Asp⁵⁵ и Asn⁵⁶, Asn⁵⁶ и Val⁵⁷ ($^1d_{\text{NH}}$, рис. 1), значения констант $^3J(\text{H-NC}^{\alpha}\text{-H})$ остатков Asp⁵⁵ и Asn⁵⁶ (<5 Гц и $7,2 \pm 0,4$ Гц соответственно [18]), медленный дейтерийобмен протона NH остатка Val⁵⁷.

На рис. 6 приведено стереоскопическое изображение пространственного строения основной полипептидной цепи токсина M₃, которое было получено расчетом на ЭВМ методом дистанционного геометрического алгоритма в «псевдоатомном» приближении [22, 23] с учетом данных ЯМР, приведенных на рис. 7. Детали расчета будут опубликованы позднее.

Сравнение конформаций скорпионовых токсинов. Нейротоксин M₃ — третий скорпионовый токсин, для которого установлено пространственное строение. Для сравнения на рис. 8 приведены укладки основной полипептидной цепи этих токсинов. Конформация токсина v-3 установлена методом рентгеноструктурного анализа [5, 6], а инсектотоксина I₅A в растворе — по данным ЯМР [1, 11–14].

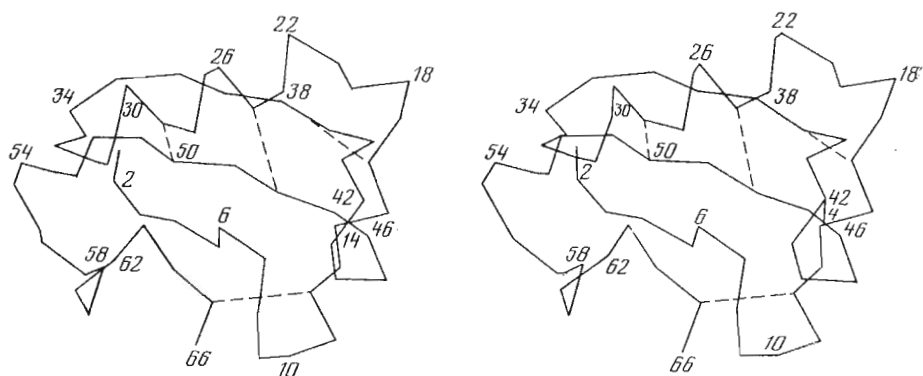


Рис. 6. Стереоскопическое представление пространственного строения доминирующего конформера токсина M_9 , полученное методом дистанционного геометрического алгоритма в псевдоатомном приближении на основе ЯЭО-контактов между протонами M_9 , зарегистрированными в спектрах NOESY (см. рис. 7). Штриховыми линиями обозначены дисульфидные связи

Все три токсина имеют сходную вторичную структуру (рис. 9). Характерно, что пространственная ориентация α -спирального участка по отношению к β -структуре фиксирована двумя дисульфидными связями. На краях спирали находятся два реверсивных поворота, один из которых также закреплен дисульфидной связью (рис. 8).

Особенно близкое соответствие наблюдается для примерно одинаковых по числу аминокислотных остатков нейротоксина M_9 и токсина v -3. Несмотря на ограниченную гомологию аминокислотных последовательностей, их конформации имеют много общих черт также и вне указанного выше кластера регулярной вторичной структуры. Так, ЯЭО-контакты в токсине M_9 указывают на сближенность протонов $C^\alpha H$ остатков Pe^6 и Pe^{59} , а также остатков Ala^7 и Val^{13} , что соответствует сближенности остатков Leu^5 с Thr^{37} и остатков Val^6 с Lys^{13} в рентгеноструктурной конформации токсина v -3. Следует еще отметить, что в токсине M_9 все пептидные связи $Xxx-Pro$ имеют *транс*-конфигурацию, тогда как в v -3 найдена *цис*-ориентация связи $Tyr^{58}-Pro^{59}$ [6] (в эквивалентном положении первичной структуры M_9 остаток пролина отсутствует). Однако, несмотря на большое сходство принципа построения пространственных структур нейротоксина M_9 и токсина v -3, их биологическая активность сильно различается. Токсин v -3 слабо активен по отношению к сверчкам [24], тогда как нейротоксин M_9 активен по отношению к млекопитающим и неактивен по отношению к насекомым [2]. «Короткий» инсектотоксин I_5A , содержащий на 30–31 аминокислотный остаток меньше, чем v -3 или M_9 , действует только на насекомых [41, 25]. Различная биологическая активность токсинов M_9 и I_5A может быть связана как с различной природой боковых цепей в эквивалентных по пространственной структуре местах, так и с наличием дополнительных аминокислотных остатков в нейротоксине M_9 . В случае токсинов M_9 и v -3 разная биологическая активность, по-видимому, обусловлена различной природой боковых цепей в аналогичных по пространственной структуре положениях, хотя не исключены воздействия небольших конформационных отличий. Например, несколько большие размеры β -структуры в молекуле M_9 или некоторые различия в C -концевой части токсинов (остатки 53–66).

Экспериментальная часть

Методика выделения нейротоксина M_9 из яда скорпиона *B. eireus* и первичная структура этого токсина приведены в работе [2].

При съемке спектров $1D$ - 1H -ЯМР использованы 0,7 мМ растворы токсина M_9 в 2H_2O . Спектры $2D$ - 1H -ЯМР сняты в 2H_2O или в смеси 1H_2O – 2H_2O (9:1) при концентрации 3–10 мМ. Для изменения значений

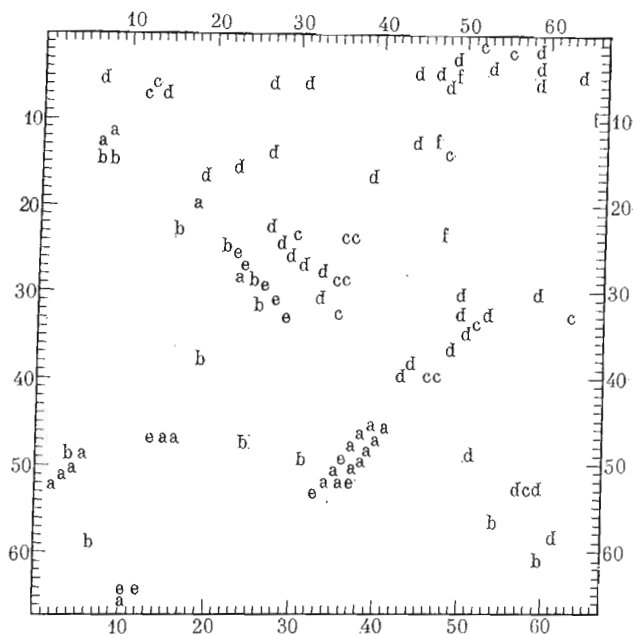


Рис. 7. Карта контактов между псевдоатомами основной (α) и боковой (β) цепей нейротоксина M_9 , использованная для расчета пространственного строения нейротоксина M_9 (см. рис. 6). Каждый контакт указан один раз либо выше, либо ниже диагонали. Буквой а обозначен контакт между псевдоатомами α и α ; b — α и β ; c — β и α ; d — β и β . Буквой е обозначены контакты между двумя парами псевдоатомов (α и α , α и β); f — двумя парами псевдоатомов (β и α , β и β). Цифры обозначают номера соответствующих аминокислотных остатков

pH использовали 0,15 и 1,5 М растворы ^2HCl или KO^2H . Эффект дейтерия на показания pH-метра не учитывался.

Спектры ЯМР снимали на спектрометре Bruker WM-500 с ЭВМ Asrest-2000 (ФРГ), используя стандартное программное обеспечение (FTQNMР, DISN83, DISN85). Сигнал от протонов растворителя насыщали дополнительным радиочастотным полем, выключаемым во время регистрации сигнала свободной индукции. Химические сдвиги сигналов приведены относительно внутреннего стандарта 2,2-диметил-2-сульфопентан-5-сульфоната натрия. Для получения спектров 1D- ^1H -ЯМР и 2D- ^1H -ЯМР (COSY и NOESY) использованы соответственно последовательности:

$$\begin{aligned} & (D-90^\circ-t_2-)_n, \\ & (D-90^\circ-t_1-90^\circ-t_2-)_n, \\ & (D-90^\circ-t_1-90^\circ-\tau_m-90^\circ-t_2-)_n, \end{aligned}$$

где D — пауза, в течение которой система возвращается в исходное состояние (1–3 с для 1D-спектров и 1,2 с для 2D-спектров); 90° — неселективный радиочастотный импульс (13,8 мкс); t_2 — время регистрации сигнала свободной индукции (0,7–1,3 с для 1D-спектров, 0,33–0,41 с для 2D-спектров); t_1 — эволюционный период. Для 2D-спектров соответствующие импульсные последовательности получены для 512 эквидистантных значений t_1 (от 1 мкс до 41 или 51 мс); n — число повторений последовательности (600–1500 раз для 1D-спектров, 136–256 раз для 2D-спектров); $\tau_m=0,2$ с — время смешивания компонентов намагниченности.

Циклирование фаз радиочастотных импульсов и приемника проведено так, чтобы выполнить квадратурное детектирование сигналов по ω_2 и устранить спектральные «артефакты» (в ряде случаев квадратурное детектирование сигналов применялось и по ω_1), а также иметь возможность помимо обычных спектров COSY и NOESY получить фазоизбирательные спектры COSY и NOESY [26, 27]. Перед преобразованием Фурье матрицы данных умножали на весовые функции и дополняли нулевыми точками для улучшения разрешения и повышения соотношения сигнал/шум.

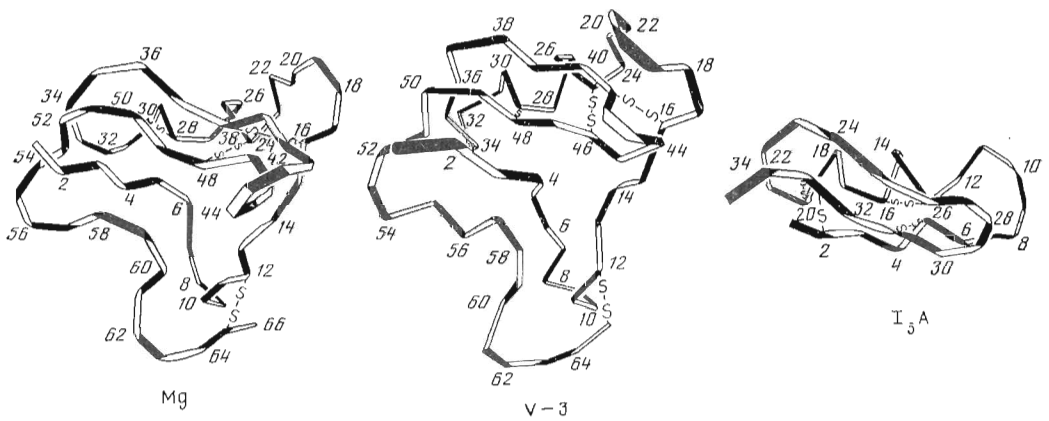


Рис. 8. Укладка полипептидных цепей скорпионовых токсинов: M₉ *B. eupreus* – доминирующий конформер в растворе, v-3 *C. sculpturatus* в кристалле [5, 6], I_{5A} *B. eupreus* в растворе [1, 11–14]

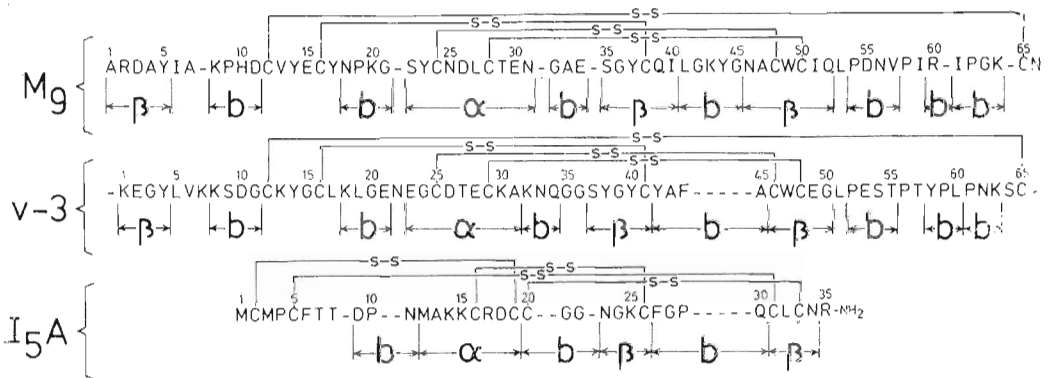


Рис. 9. Первичные структуры нейротоксина M₉ *B. eupreus*, токсина v-3 *C. sculpturatus* и инсектотоксина I_{5A} *B. eupreus* с указанием положения a_R спирального (←α→) и β-структурных (←β→) участков, а также изгибов и реверсивных поворотов полипептидной цепи (←b→). Аминокислотные последовательности токсинов выстроены с целью максимального приближения положения регулярных вторичных структур, изгибов и поворотов. Для токсинов M₉ и v-3 положения остатков чистина приняты инвариантными, поскольку эти токсины имеют одинаковую систему замыкания дисульфидных связей

В полученных таким образом обычных спектрах COSY или NOESY разрешение составляло 5–6 Гц на точку по обоим направлениям ω₁ и ω₂, в фазоизбирательных спектрах COSY или NOESY разрешение по ω₁ составляло 5–6 Гц на точку, а по ω₂ – 0,8–3 Гц на точку. Константы спи-спинового взаимодействия ³J(H-NC^α-H) измерены по расщеплению кросс-пиков пептидных протонов NH по направлению ω₁ = const фазоизбирательных спектров COSY или NOESY, имеющих разрешение 0,4 Гц на точку.

Медленно обменивающиеся пептидные протоны NH идентифицированы по кросс-пикам в одновременно зарегистрированных спектрах COSY и NOESY по методу [28], снятых в ²H₂O (pH 2,5, 30° С, 31 ч). Перед началом накопления образец предварительно выдерживали в тех же условиях в течение 14 ч. Для медленно обменивающихся пептидных протонов NH константа обмена $k_{00} < 6 \cdot 10^{-6}$ с оценена, исходя из того, что через 15,5 ч после начала регистрации спектров интенсивность сигналов от медленно обменивающихся протонов составляла более 50% от исходной интенсивности.

Моделирование укладки основной полипептидной цепи токсина M₉ проведено с использованием программы дистанционного геометрического алгоритма [22, 23]. Программа позволяет получать декартовы координаты атомов, удовлетворяющие наложенным ограничениям на расстояния:

$$l_{ij} < d_{ij} < u_{ij},$$

где $d_{ij} = \sqrt{(x_i - x_j)^2 + (y_i - y_j)^2 + (z_i - z_j)^2}$ — расстояние между атомами i и j ; l_{ij} и u_{ij} — ограничения на расстояния между атомами i и j , x , y , z — координаты атомов. В настоящей работе использовано упрощенное представление аминокислотных остатков двумя псевдоатомами (α и β), включающими атомы основной и боковой цепи соответственно.

Авторы выражают благодарность Е. В. Гришину и Т. М. Волковой (Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва) за предоставление нейротоксина *M. B. eireus* и полезные обсуждения результатов работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ovchinnikov Yu. A. Pure and Appl. Chem., 1984, v. 56, № 8, p. 1049–1068.
2. Волкова Т. М., Гарсия А. Ф., Тележинская И. Н., Потанинко Н. А., Гришин Е. В. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 11, с. 1445–1456.
3. Rochat H., Bernard P., Couraud F. In: Advances in Cytopharmacology/Eds Ceccarelli B., Clementi F. N. Y.: Raven Press, 1979, v. 3, p. 325–334.
4. Dufton M. J., Rochat H. J. Mol. Evol., 1984, v. 20, p. 120–127.
5. Fontecilla-Camps J. C., Almassy R. J., Ealick S. E., Suddath F. L., Watt D. D., Feldmann R. J., Bugg C. E. Trends in Biochem. Sci., 1981, v. 6, № 11, p. 291–296.
6. Almassy R. J., Fontecilla-Camps J. C., Suddath F. L., Bugg C. E. J. Mol. Biol., 1983, v. 170, № 2, p. 497–527.
7. Krishna N. R., Bugg C. E., Stephens R. L., Watt D. D. J. Biomol. Structure and Dynamics, 1983, v. 1, № 3, p. 829–842.
8. Possani L., Steinmetz W. E., Dent M. A. R., Alagón A. C., Wüthrich K. Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 669, № 2, p. 183–192.
9. Dufton M. J., Drake A. F., Rochat H. Biochim. et biophys. acta, 1986, v. 869, № 1, p. 16–22.
10. Chicheportiche R., Lazdunski M. Eur. J. Biochem., 1970, v. 14, № 3, p. 549–555.
11. Арсеньев А. С., Кондаков В. И., Майоров В. Н., Волкова Т. М., Гришин Е. В., Быстров В. Ф., Овчинников Ю. А. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 6, с. 768–793.
12. Арсеньев А. С., Кондаков В. И., Майоров В. Н., Быстров В. Ф., Овчинников Ю. А. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 12, с. 1667–1689.
13. Arseniev A. S., Kondakov V. I., Maiorov V. N., Bystrov V. F. FEBS Lett., 1984, v. 165, № 1, p. 57–62.
14. Maiorov V. N., Arseniev A. S. J. Mol. Struct., 1984, v. 114, p. 399–402.
15. Anil Kumar, Wagner G., Ernst R. R., Wüthrich K. J. Am. Chem. Soc., 1981, v. 103, № 13, p. 3654–3658.
16. Keepers J. W., James T. L. J. Magn. Res., 1984, v. 57, № 3, p. 404–426.
17. Wüthrich K., Billeter M., Braun W. J. Mol. Biol., 1984, v. 180, № 3, p. 715–740.
18. Bystrov V. F. In: Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy, 1976, v. 10, p. 41–81.
19. Pardi A., Billeter M., Wüthrich K. J. Mol. Biol., 1984, v. 180, № 3, p. 741–751.
20. Wagner G., Anil Kumar, Wüthrich K. Eur. J. Biochem., 1981, v. 114, № 2, p. 375–384.
21. Wagner G., Wüthrich K. J. Mol. Biol., 1982, v. 160, № 2, p. 343–361.
22. Майоров В. Н., Арсеньев А. С., Быстров В. Ф. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 9, с. 1192–1209.
23. Braun W., Bosh C., Brown L. R., Go N., Wüthrich K. Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 667, № 22, p. 377–396.
24. Babin D. R., Watt D. D., Goos S. M., Mlejnek R. V. Arch. Biochem. Biophys., 1974, v. 164, № 2, p. 694–706.
25. Гришин Е. В., Волкова Т. М., Солдатова Л. Н. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 2, с. 155–164.
26. Wider G., Macura S., Anil Kumar, Ernst R. R., Wüthrich K. J. Magn. Res., 1984, v. 56, № 2, p. 207–234.
27. Marion D., Wüthrich K. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1983, v. 113, № 3, p. 967–974.
28. Gurevich A. Z., Barsukov I. L., Arseniev A. S., Bystrov V. F. J. Magn. Res., 1984, v. 56, № 3, p. 471–478.

Поступила в редакцию
2.IV.1986.

SPATIAL STRUCTURE OF THE NEUROTOXIN M₉ *BUTHUS EUPEUS* IN SOLUTION AS REVEALED BY ¹H-NMR SPECTROSCOPY

PASHKOV V. S., HOANG N. A., MAIOROV V. N., BYSTROV V. F.

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

Neurotoxin M₉ isolated from the venom of Central Asian scorpion *Buthus eupeus* (66 amino acid residues, 4 disulfide bridges) has two slowly exchangeable conformations at the acidic pH. 2D-¹H-NMR spectroscopy has been used to determine the polypeptide backbone folding in the conformer that dominates under physiological conditions. The conformer contains the right α -helix (residues 22–31) and the antiparallel β -sheet, which consists of the three strands (residues 1–5, 46–52, 35–40). All five Xxx-Pro bonds are in the *trans* configuration. Comparison of the obtained data with the crystal structure of the homologous scorpion toxin ν -3 *Centruroides sculpturatus* (65 residues) and the solution spatial structure of the «short» type insectotoxin I₅A *Buthus eupeus* (35 residues) shows close similarity in the first case and similarity of the types and mutual disposition of the regular secondary structure elements in the second case.