



УДК 577.112.012.6: 543.422.25

© 1990 г.

А. Л. Ломизе, А. С. Арсеньев, Н. В. Масленников,

В. Ф. БыстровОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛОКАЛЬНОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВОГО
ИНСЕКТОТОКСИНА I₅A СКОРПИОНА *BUTHUS EUROPEUS*
ПО ДАННЫМ СПЕКТРОСКОПИИ ¹H-ЯМР

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва

На основе измеренных интегральных интенсивностей кросс-пиков ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) и констант спин-спинового взаимодействия (КССВ) протонов $\text{H}-\text{NC}^{\alpha}-\text{H}$ и $\text{H}-\text{C}^{\alpha}\text{C}^{\beta}-\text{H}$ определена локальная структура (торсионные углы φ , ψ и χ^1 аминокислотных остатков) инсектотоксина I₅A (35 остатков) скорпиона *Buthus eupeus*. Расчет локальной структуры проведен путем согласования полной матрицы релаксации протонов каждой пептидной единицы (состоящей из протонов рассматриваемого остатка и протона NH следующего в аминокислотной последовательности остатка) с экспериментальными интенсивностями соответствующих кросс-пиков ЯЭО в двумерных ¹H-ЯМР-спектрах NOESY. В результате для торсионных углов φ и ψ основной цепи инсектотоксина определены диапазоны значений, составляющие в среднем соответственно 28 и 93°, в пределах которых удовлетворительно согласуются расчетные и экспериментальные интенсивности кросс-пиков ЯЭО и КССВ. Доминирующий ротамер боковой цепи однозначно определен для 42% аминокислотных остатков инсектотоксина, а еще для 46% остатков идентифицировано два возможных ротамера. Полученные значения торсионных углов φ , ψ и χ^1 соответствуют стерически разрешенным конформациям аминокислотных остатков и согласуются с вторичной структурой инсектотоксина, установленной ранее по данным спектроскопии ¹H-ЯМР.

За последние годы спектроскопия ¹H-ЯМР зарекомендовала себя как эффективный метод анализа пространственной структуры белков [1, 2]. Однако определение координат атомов молекулы белка путем согласования с различными спектральными параметрами, среди которых наиболее информативны константы спин-спинового взаимодействия (КССВ), зависящие от торсионных углов, и интенсивности кросс-пиков ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО), зависящие от межпротонных расстояний, по-прежнему является сложной задачей. Первым этапом ее решения может быть анализ локальной структуры белка, т. е. расчет торсионных углов φ_i , ψ_i , χ_i^1 по интенсивностям кросс-пиков ЯЭО и КССВ, наблюдаемым в пределах пептидной единицы, в состав которой включены протоны данного аминокислотного остатка и протон NH следующего в первичной структуре остатка (рис. 1) [3–6]. Недавно нами было показано, что анализ межпротонных расстояний в изолированной пептидной единице белка можно проводить по данным об интенсивностях соответствующих этим протонам кросс-пиков ЯЭО и определять на этой основе торсионные углы φ_i , ψ_i и χ_i^1 [4]. Теоретическое моделирование [6] и практическое применение полученных при анализе локальной структуры данных для реконструкции полной пространственной структуры белка [5] показали, что предварительный анализ локальной структуры существенно повышает эффективность дальнейшего расчета и точность определения координат атомов.

Предложенный нами метод анализа локальной структуры белка [4] заключается в согласовании полной матрицы релаксации протонов каждой пептидной единицы (рис. 1) с экспериментальными интенсивностями кросс-пиков ЯЭО путем варьирования торсионных углов φ_i , ψ_i , χ_i^1 и времени корреляции вращения белковой глобулы τ_c . Для проверки метода

нами проведен модельный расчет локальной структуры бычьего панкреатического ингибитора трипсина (BPTI) [4]. Расчет показал, что для большинства аминокислотных остатков удается достаточно надежно определить торсионные углы, причем использованные приближения (учет передачи намагниченности лишь внутри пептидной единицы и идеализация геометрии) незначительно влияют на получаемые результаты. В этом модельном расчете интенсивности кросс-пиков ЯЭО, наблюдаемых в двумерных спектрах NOESY, вычисляли теоретически. На практике, однако,

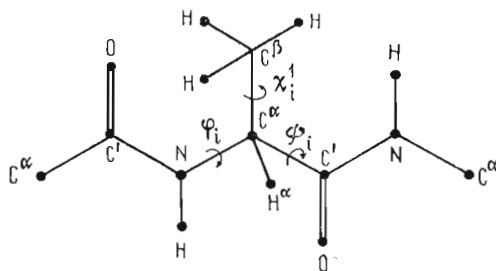


Рис. 1. Принятое в статье определение пептидной единицы, которая включает протоны i -го аминокислотного остатка (в данном случае аланина) и протон NH $i + 1$ -го остатка

такие факторы, как внутримолекулярная подвижность белка, погрешность измерения объемов кросс-пиков ЯЭО и неполнота экспериментальных данных, обусловленная перекрытием кросс-пиков в спектрах NOESY, могут оказывать существенное влияние на результаты анализа локальной структуры.

Настоящая работа посвящена анализу локальной структуры инсектотоксина I₅A скорпиона *Vuthus eureus* — небольшого белка, состоящего из 35 аминокислотных остатков и содержащего 4 дисульфидные связи [7], и является первым этапом проводимого нами уточнения пространственной структуры молекулы. Трехмерная структура инсектотоксина, включающая в себя α-спираль Pro¹⁰ — Cys¹⁹ и антипараллельную β-структуру Gly²⁴ — Cys³³, ранее была реконструирована по данным спектроскопии ¹H-ЯМР с помощью дистанционного геометрического алгоритма в псевдодатомном приближении [8—10].

Результаты и обсуждение

Расчет локальной структуры инсектотоксина проводили на основе измеренных в настоящей работе интегральных интенсивностей (объемов) кросс-пиков ЯЭО (табл. 1) и полученных ранее КССВ протонов H—NC^α—H ($J_{N\alpha}$) и H—C^αC^β—H ($J_{\alpha\beta}$) [9, 10]. Интенсивности кросс-пиков ЯЭО в спектрах NOESY, полученных при двух значениях времени обмена компонент намагниченности τ_m (100 и 200 мс), измеряли только для кросс-пиков с участием амидных протонов, поскольку кросс-пики в алифатической области спектров NOESY инсектотоксина сильно перекрываются. Следует отметить, что многие кросс-пики амидных протонов также перекрываются друг с другом или замаскированы спектральными помехами (они обозначены буквой «ш» в табл. 1) и поэтому не были использованы при расчете локальной структуры.

Предварительный анализ локальной структуры. Конформации большинства аминокислотных остатков инсектотоксина можно приближенно охарактеризовать, воспользовавшись методикой, предложенной в работе [4]. С этой целью нужно прежде всего использовать КССВ $J_{\alpha\beta}$ для оценки взаимного расположения α- и β-протонов (*транс* или *гош*). Обозначим *транс*- и *гош*-ориентированные β-протоны соответственно как H^{βt} и H^{βg}. Из стереохимической зависимости $J_{\alpha\beta}$ [11] следует, что ориентации *транс* (H^{βt}) соответствует $J_{\alpha\beta} > 10$ Гц, а *гош* (H^{βg}) — $J_{\alpha\beta} < 5$ Гц. Исходя из этого можно определить конформации боковой цепи (рис. 2). Так,

Интегральные интенсивности (объемы в произвольных единицах)
кросс-пиков ЯЭО между протонами пептидных единиц инсектотоксина
(концентрация белка 5 мМ, рН 3,2, 30° С) *

В верхней строке для каждого остатка указаны интенсивности,
измеренные в спектре NOESY с временем обмена компонент
намагниченности $\tau_m=100$ мс, а в нижней — с $\tau_m=200$ мс

Остаток i	Интенсивность кросс-пика ЯЭО **						
	NH_i /протоны остатка i			NH_{i+1} /протоны остатка i			
	H_i^α	H_i^β	другие	NH_i	H_i^α	H_i^β	другие
Met ¹					220 293	0; 110 0; 195	γ : 0 γ : 0
Cys ²	50 63	167; 85 281; 194		326 239	0 59	0; 42 0; 98	
Met ³	π π	0; 25 23; 50	γ : 57; 0 γ : 74; 57				
Pro ⁴					π π	0; 25 0; 39	δ : 0; π δ : 0; π
Cys ⁵	π π	140; π 180; 53		0 44	270 534	0; π 0; π	
Phe ⁶	π π	0; π 58; π	r : 0 r : 0	0 32	251 464	24; 0 51; 0	r : 0 r : 0
Thr ⁷	71 112	6 16	γ : 81 γ : 136	106 138	0 87	0 0	
Thr ⁸	88 50	49 141	γ : π γ : 620	π π	40 π	0 π	
Asp ⁹	20 π	234; 192 303; 271					
Pro ¹⁰					51 88	0; 51 0; 102	δ : 25; 65 δ : 49; 99
Asn ¹¹	100 152	29; 117 94; 241		367 373	41 65	π π	
Met ¹²	94 167	242; 142 398; 272	γ : π γ : π ; 20	156 117	0 20	25; 126 58; 188	γ : 0 γ : 10; 52
Ala ¹³	95 144	222 323		315 193	0 22	π 195	
Lys ¹⁴	84 171	310 502		135 171	0 24	π ; π π	
Lys ¹⁵	91 148	π ; 0 412; 52		π π	47 27	61; 0 76; 0	γ : 0 γ : 0
Cys ¹⁶	π π	91; 142 171; 216		160 99	0 π	0; 72 30; 159	
Arg ¹⁷	89 144	134; 118 222; 236	γ : 0 γ : 0; 18	176 197	0 31	48; 41 88; 100	γ : 0 γ : 0
Asp ¹⁸	74 103	193 366		105 150	0 36	143 191	
Cys ¹⁹	66 174	105; 182 159; 263		189 192	π π	π π	
Cys ²⁰	π π	71; 104 129; 310		116 154	0 π	0 11; 36	
Gly ²¹	83; 251 207; 409			142 119	0; 0 47; 78		
Gly ²²	π ; 135 97; 267			192 186	0; 27 61; 39		
Asn ²³	73 218	64; 38 74; 37		0 π	315 640	0 π	
Gly ²⁴	π ; 30 π ; 131			0 0	π ; 38 π ; 56		
Lys ²⁵	75 143	77 168	γ : 46 γ : 28	0 0	339 451	67 98	γ : 31 γ : 52

Таблица 1 (продолжение)

Остаток i	Интенсивность кросс-пика ЯЭО **						
	NH_i / протоны остатка i			NH_{i+1} / протоны остатка i			
	H_i^α	H_i^β	другие	NH_i	H_i^α	H_i^β	другие
Cys ²⁶	34 64	268 469		0 0	340 623	π ; 0 π	
Phe ²⁷	29 64	172 380	r : 119 r : 147	0 0	256 466	0 57	r : 0 r : 0
Gly ²⁸	69; 276 148; 483						
Pro ²⁹					0 98	0 0	δ : 73; 37 δ : 74; 65.
Gln ³⁰	π π	163; 0 214; 0	γ : 51 γ : 117	0 0	π π	0 0	γ : 0 γ : 0
Cys ³¹	57 46	135; 94 250; 136		0 π	π 404	0 21; 0	
Leu ³²	π π	π π	δ : 30; 18 δ : 64; π	π π	429 742	139; 73 213; 154	γ : 69; γ : 92.
Cys ³³	20 75	24; 129 65; 228		0 π	261 405	55; 69 124; 128	
Asn ³⁴	104 234	π 439		π π	79 138	0 0	
Arg ³⁵	50 101	0; 79 π ; 78	γ : 0 γ : 56				

* Условия получения спектров NOESY, методика измерения объемов кросс-пиков ЯЭО и оценка погрешности их измерения описаны в «Экспериментальной части». Погрешность измерения интенсивностей колеблется от 1 до 45%, но в подавляющем большинстве случаев не превышает 20%. Интенсивность, равная нулю, указана в тех случаях, когда кросс-пик не наблюдается в спектре (в этом случае погрешность измерения интенсивности, соответствующая уровню шума, принята равной 20 единицам). Буквой « π » обозначены кросс-пики ЯЭО с участием α - и β -протонов, перекрываются с полосами шума или другими кросс-пиками в спектре NOESY.

** Для β - и γ -протонов на первом месте приведена интенсивность для β - или γ -протона с большим значением химического сдвига. Подчеркнуты интенсивности с участием β -протонов, которые, судя по величине $J_{\alpha\beta}$, расположены в *транс*-ориентации ($\text{H}^{\beta t}$) относительно α -протона. Остальные β -протоны находятся в *гауз*-ориентации ($\text{H}^{\beta g}$) относительно α -протона для всех остатков, кроме Arg³⁷, Asn²³, Asn³⁴ и Arg³⁵, где наблюдаемые значения КССВ соответствуют усредненным для нескольких ротамеров, а также Lys⁴ и Lys²⁵, где не удается измерить КССВ, поскольку химические сдвиги двух β -протонов близки [9]. В ряде случаев указана интенсивность суммарного кросс-пика с участием обоих β - или γ -протонов. Буквой « π » обозначены суммарные кросс-пики ЯЭО, образованные всеми протонами ароматического кольца.

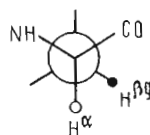
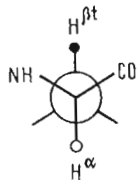
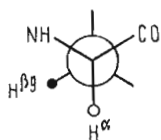
например, для остатков Thr⁷ и Thr⁸ значение КССВ единственного β -протона с протоном H^α меньше 5 Гц, что согласуется (см. рис. 2) с двумя ротамерами — t и g^- (см. табл. 2). Для остатков Met¹ и Met³ КССВ обоих β -протонов также меньше 5 Гц, что (см. рис. 2) однозначно соответствует ротамеру боковой цепи g^- (см. табл. 2). Для большинства остальных остатков инсектотоксина КССВ одного из β -протонов меньше 5 Гц, а другого — больше 10 Гц (см. табл. 2). В этом случае два ротамера (t и g^+ , см. рис. 2) согласуются с величинами $J_{\alpha\beta}$. Какой из этих двух ротамеров реализуется в растворе, иногда можно определить по интенсивностям кросс-пиков ЯЭО. Так, например, для остатков Cys², Met¹², Asn¹¹ и Cys¹⁹ преобладает ротамер t , поскольку (см. [4]), как видно из табл. 1, кросс-пик $\text{NH}_i/\text{H}_i^{\beta g}$ не только не уступает по интенсивности, но даже превосходит кросс-пик $\text{NH}_i/\text{H}_i^{\beta t}$. Следует подчеркнуть, что в ротамерах t и g^+ возможны разные варианты стереохимического отнесения β -протонов (как видно из рис. 2, для ротамера t протон $\text{H}^{\beta t} \equiv \text{H}^{\beta 3}$ и $\text{H}^{\beta g} \equiv \text{H}^{\beta 2}$, а для g^+ , наоборот, $\text{H}^{\beta t} \equiv \text{H}^{\beta 2}$ и $\text{H}^{\beta g} \equiv \text{H}^{\beta 3}$). Если установлен ротамер боковой цепи, то по КССВ автоматически определяется и стереохимическое отнесение.

Далее можно оценить конформацию основной цепи. Для всех остатков на α -спиральном участке Pro¹⁰ — Cys²⁰ (а также для Cys², Thr⁷ и Thr⁸) интенсивности кросс-пиков ЯЭО $\text{NH}_i/\text{NH}_{i+1}$ гораздо выше, чем

Остаток

Ротамер (χ') $t(180^\circ)$ $g^+(-60^\circ)$ $g^- (60^\circ)$

Thr, Ile:



Val:

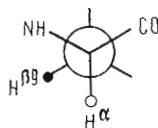
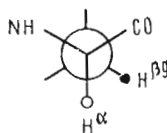
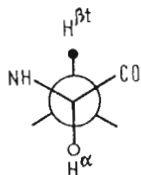
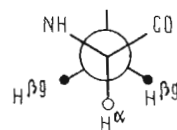
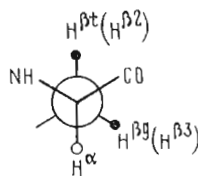
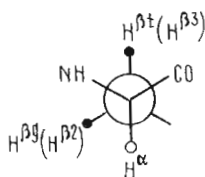
Остальные
остатки

Рис. 2. Принятые в данной статье в соответствии с номенклатурой IUPAC [12] обозначения ротамеров (t , g^+ и g^-) по связи $C^\alpha - C^\beta$ боковой цепи остатков и протонов $H^{\beta t}$ ($H^{\beta t}$ или $H^{\beta g}$) в зависимости от их ориентации (соответственно *транс* или *гош*) по отношению к протону H^α . Для остатков, имеющих два β -протона, в скобках указано их стереохимическое отнесение по номенклатуре IUPAC

NH_i/H_i^α при обоих значениях τ_m (табл. 1), как это и должно быть в соответствующей « α -спиральной» области R конформационной карты, построенной по углам основной цепи ϕ и ψ [4]. Следует отметить, что для остатков Cys², Asn¹¹, Met¹² и Cys¹⁹ интенсивность кросс-пика ЯЭО NH_i^t/NH_{i+} больше, чем NH_i^α/NH_{i+1} , что дополнительно указывает на характерный для α -спирали диапазон значений угла ψ_i от -90 до -10° [4]. На участках β -структуры (Lys²³—Phe²⁷ и Glu³⁰—Cys³³) интенсивность кросс-пика NH_i/NH_i^α существенно выше, чем NH_i/NH_{i+1} (табл. 1), что соответствует « β -структурной» области B конформационной карты [4]. К области B , по-видимому, можно отнести и остатки Met¹, Cys⁵, Phe⁶ и Asn²³ (табл. 1).

Штрафная функция $F_{ЯЭО}$ и ее зависимость от времени корреляции τ_c . Для количественного анализа локальной структуры инсектотоксина вычисляли функцию $F_{ЯЭО}$, представляющую среднее отклонение нормированных значений экспериментальных ($I_k^{эксп}$) и расчетных ($I_k^{расч}$) интенсивностей кросс-пиков ЯЭО между протонами пептидной единицы (рис. 1) с учетом погрешности измерения интенсивностей δ_k [4]:

$$F_{ЯЭО} = 1/M \sum_{k=1}^M \max \{ |I_k^{эксп} - I_k^{расч}| - \bar{\delta}_k, 0 \}, \quad (1)$$

где $I_k^{эксп} = I_k^{эксп} / (1/M \sum_{j=1}^M I_j^{эксп})$, $I_k^{расч} = I_k^{расч} / (1/M \sum_{j=1}^M I_j^{расч})$, $\bar{\delta}_k = \delta_k / (1/M \sum_{j=1}^M I_j^{эксп})$

k — номер кросс-пика ЯЭО и M — число кросс-пиков для пептидной единицы. Функция $F_{ЯЭО}$ учитывает и отсутствие кросс-пиков ЯЭО в спектре NOESY. Для них $I_k^{эксп} = 0$ (см. табл. 1). Погрешность измерения δ_k обусловлена уровнем шума в окрестности соответствующего кросс-пика ЯЭО в спектре NOESY (см. «Экспериментальную часть»).

Интенсивности $I_k^{расч}$ вычисляли по координатам протонов, зависящим от торсионных углов ϕ_i , ψ_i , χ_i , времен спин-решеточной релаксации

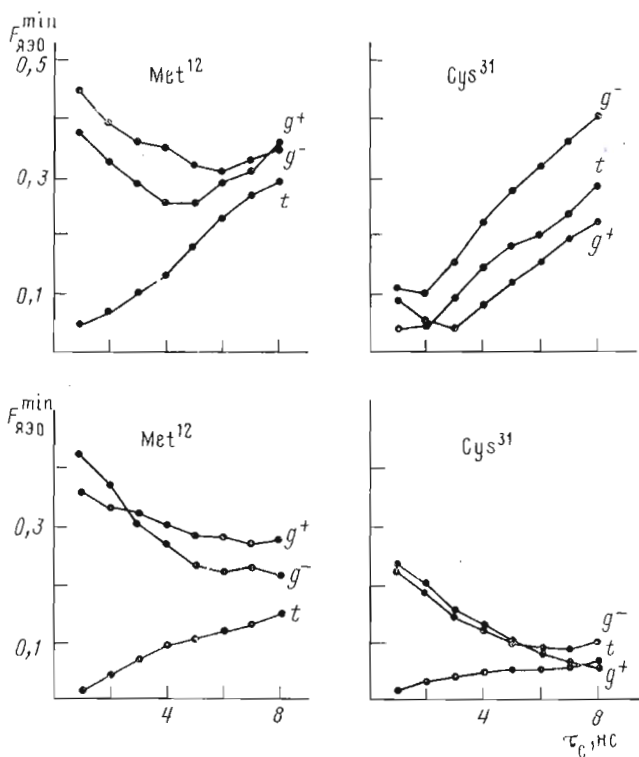


Рис. 3. Зависимости минимальных значений функции $F_{ЯЭО}$ ($F_{ЯЭО}^{min}$), полученных при минимизации по торсионным углам φ_i , ψ_i и χ_i , от времени корреляции τ_c для пептидных единиц Met^{12} и Cys^{31} при $\tau_m = 200$ мс (вверху) и 100 мс (внизу). Зависимости строили для ротамеров t , g^- и g^+ (угол $\chi^1 = 180 \pm 30$, 60 ± 30 и $-60 \pm 30^\circ$ соответственно)

протонов T_1 и времени корреляции вращения белковой глобулы τ_c (см. «Экспериментальную часть»). Так как времена T_1 для протонов инсектотоксина измерены экспериментально, то штрафная функция $F_{ЯЭО}$ для i -й пептидной единицы зависит от торсионных углов φ_i , ψ_i , χ_i и времени τ_c . При этом время корреляции (τ_c) рассматривали как свободный параметр.

Время корреляции (τ_c), обеспечивающее наилучшее согласование интенсивностей, должно соответствовать минимумам зависимостей $F_{ЯЭО}^{min}$ от τ_c , где $F_{ЯЭО}^{min}(\tau_c)$ — значение $F_{ЯЭО}$, полученное путем минимизации по торсионным углам φ_i , ψ_i и χ_i при заданном времени τ_c . Характерные зависимости $F_{ЯЭО}^{min}(\tau_c)$ (на примере пептидных единиц Met^{12} и Cys^{31}) приведены на рис. 3. Ситуация для Met^{12} наиболее типична. Здесь можно отчетливо выделить ротамер боковой цепи (t), характеризующийся наименьшей величиной штрафной функции, которая возрастает при увеличении τ_c . Для других ротамеров Met^{12} штрафная функция велика и убывает с ростом τ_c , поскольку по мере роста τ_c из-за усиления спиновой диффузии между геминальными β -протонами выравниваются расчетные интенсивности кросс-пиков ЯЭО с участием β -протонов [4]. В случае Cys^{31} зависимости $F_{ЯЭО}^{min}(\tau_c)$, построенные при разных значениях τ_m , различаются (рис. 3). Это обусловлено разным соотношением интенсивностей кросс-пиков ЯЭО при $\tau_m = 100$ и 200 мс: для остатка Cys^{31} при увеличении τ_m интенсивность кросс-пиков NH_i/H_i^{β} возрастает, а NH_i/H_i^{α} уменьшается (см. табл. 1).

Для всех рассмотренных пептидных единиц инсектотоксина штрафная функция $F_{ЯЭО}^{min}(\tau_c)$ минимальна при $\tau_c = 1$ нс. Значения τ_c ниже 1 нс не рассматривали, поскольку в этом случае перестает выполняться соотношение $(2\pi\nu_0\tau_c)^2 \gg 1$ (где ν_0 — рабочая частота 500 МГц ЯМР-спектро-

Определение ротамеров C^α-C^β боковых цепей аминокислотных остатков инсектотоксина по КССВ протонов Н-C^α(C^β-H) (J_{αβ}) и величине штрафной функции F^г_{ЯЭО} для кросс-пиков ЯЭО между протонами пептидных единиц

Остаток	F ^г _{ЯЭО} ^{min} · 100* для			J _{αβ} ^г , Гц (из [9])	Ротамеры боковой цепи	
	g ⁺	g ⁻	t		согласующиеся с J _{αβ} ^{г*}	согласующиеся с J _{αβ} ^г и F ^г _{ЯЭО} ^{4*}
Met ¹				4,6; 4,6	g ⁻	g ⁻
Cys ²	28	14	2	<u>4,3</u> ; 10,5	g ⁺ , t	t
	36	25	10			
Met ³	5	5	41	3,5; 3,5	g ⁻	g ⁻
	1	0	43			
Cys ⁵	0	0	0	12,2; 2,7	g ⁺ , t	g ⁺ или t
	0	0	5			
Phe ⁶	13	13	13	3,6; 11,4	g ⁺ , t	g ⁺ или t
	8	9	5			
Thr ⁷	34	9	5	3,5	g ⁻ , t	g ⁻ или t
	35	5	7			
Thr ⁸	0	15	0	2,0	g ⁻ , t	g ⁻ или t
	82	6	0			
Asp ⁹	25	27	12	12,2; <u>3,6</u>	g ⁺ , t	t
	0	0	0			
Asn ¹¹	1	1	2	3,9; 11,4	g ⁺ , t	g ⁺ или t
	0	0	0			
Met ¹²	34	39	2	<u>4,2</u> ; 11,7	g ⁺ , t	t
	40	33	6			
Lys ¹⁴	0	0	0	5*	Любой	Любой
	1	1	1			
Lys ¹⁵	17	28	17	11,0; 3,2	g ⁺ , t	g ⁺ или t
	18	18	23			
Cys ¹⁶	12	22	0	<u>5,8</u> ; 12,3	g ⁺ , t	t
	13	17	1			
Arg ¹⁷	33	41	6	<u>6,3</u> ; 9,0	6*	t
	31	43	4			
Asp ¹⁸	0	1	3	11,6; 3,1	g ⁺ , t	g ⁺ или t
	1	5	1			
Cys ¹⁹	43	17	0	11,5; <u>3,7</u>	g ⁺ , t	t
	31	6	2			
Cys ²⁰	4	3	0	2,0; 12,6	g ⁺ , t	g ⁺ или t
	5	3	0			
Asn ²³	2	2	1	8,1; 6,2	6*	Любой
	0	0	0			
Lys ²⁵	1	6	15	5*	Любой	g ⁺ или g ⁻
	5	11	9			
Cys ²⁶	10	14	11	2,5; 12,5	g ⁺ , t	g ⁺ или t
	5	8	6			
Phe ²⁷	3	5	17	3,9; <u>9,6</u>	g ⁺ , t	g ⁺
	1	3	11			
Gln ³⁰	16	16	29	<u>10,7</u> ; 3,8	g ⁺ , t	g ⁺
	25	25	40			
Cys ³¹	21	21	3	12,0; <u>4,9</u>	g ⁺ , t	t
	6	10	5			
Leu ³²	0	2	0	11,8; 3,4	g ⁺ , t	g ⁺ или t
	0	0	0			
Cys ³³	17	18	24	3,9; 12,7	g ⁺ , t	g ⁺ или t
	9	11	19			
Asn ³⁴	0	0	0	6,3; 8,2	6*	Любой
	0	0	0			

* F^г_{ЯЭО}^{min} — минимальные значения штрафной функции F^г_{ЯЭО}, полученные для ротамеров боковых цепей при τ_m = 100 мс (верхняя строка) и 200 мс (нижняя строка). Минимизация проводилась по углам φ_i, ψ_i и χ_i; при этом угол χ_i удерживался в интервале ±30° относительно стандартных для ротамеров t, g⁺ и g⁻ значений 180, -60 и 60°.

метра, на котором выполнены эксперименты), лежащее в основе теоретической модели, использованной для расчета интенсивностей кросс-пиков ЯЭО [4]. Величина $\tau_c = 1$ нс несколько ниже времени корреляции вращения сферической белковой глобулы (1,7 нс), рассчитанного по уравнению Стокса, исходя из молекулярного веса инсектотоксина, для водного раствора при 30° С. Понижение времени корреляции может быть обусловлено внутримолекулярной подвижностью инсектотоксина. В то же время следует учесть, что ошибка в оценке времени τ_c даже в 2 раза почти не сказывается на результатах расчета локальной структуры белка [4]. В дальнейшем при определении локальной структуры инсектотоксина использовали $\tau_c = 1$ нс.

Определение конформаций боковых цепей инсектотоксина основывалось на трех независимых наборах экспериментальных данных — интенсивностях кросс-пиков ЯЭО, измеренных при $\tau_m = 100$ и 200 мс и КССВ протонов $\text{H}-\text{C}^\alpha\text{C}^\beta-\text{H}$ и $\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H}$. По величине $J_{\alpha\beta}$, как уже обсуждалось, для большинства аминокислотных остатков инсектотоксина можно определить преобладающие ротамеры боковой цепи (см. табл. 2). Кроме того, для каждой пептидной единицы инсектотоксина вычисляли минимум штрафной функции $F_{\text{ЯЭО}}(\varphi_i, \psi_i, \chi_i)$ ($F_{\text{ЯЭО}}^{\text{min}}$) для трех (g^+ , g^- и t) ротамеров боковой цепи, характеризующихся величиной угла $\chi^1 = -60 \pm 30$, 60 ± 30 и $180 \pm 30^\circ$ соответственно (рис. 2). Сравнение значений $F_{\text{ЯЭО}}^{\text{min}}$, полученных при $\tau_m = 100$ и 200 мс (табл. 2), позволяет оценить угол χ^1 для большинства аминокислотных остатков инсектотоксина.

Величина $F_{\text{ЯЭО}}^{\text{min}}$ обычно минимальна для ротамера, согласующегося с КССВ $J_{\alpha\beta}$ (табл. 2) (исключением является Thr^8 , где, как указано в табл. 1, один из интенсивных кросс-пиков ЯЭО не удалось измерить из-за спектральной помехи, присутствующей в NOESY при $\tau_m = 100$ мс). Естественно считать, что реализуются ротамеры, характеризующиеся наименьшим значением $F_{\text{ЯЭО}}^{\text{min}}$ при обоих значениях τ_m и согласующиеся с величиной $J_{\alpha\beta}$ (см. табл. 2). Если при отборе ротамеров боковых цепей остатков инсектотоксина использовать критерий $\Delta F_{\text{ЯЭО}} = (F_{\text{ЯЭО}} - F_{\text{ЯЭО}}^{\text{min}}) < 0,1$, то ротамер боковой цепи однозначно определяется для 42% всех (исключая Gly , Ala и Pro) аминокислотных остатков инсектотоксина, а для 46% остатков с экспериментальными данными согласуются два ротамера.

Очевидно, что в нашем рассмотрении следует выделить ситуацию, когда относительные населенности ротамеров по связи $\text{C}^\alpha-\text{C}^\beta$ близки. О ее наличии для боковых цепей остатков Asn^{23} и Asn^{34} свидетельствуют усредненные значения $J_{\alpha\beta}$ и идентичность величин $F_{\text{ЯЭО}}^{\text{min}}$ для всех ротамеров (табл. 2). Для остатка Arg^{17} $J_{\alpha\beta}$ составляют 6,3 и 9,0 Гц, т. е. близки к усредненным (или наблюдаемым для нестандартных ротамеров), однако величина $F_{\text{ЯЭО}}^{\text{min}}$ существенно меньше для ротамера t (табл. 2), и, вероятно, он является доминирующим.

Для ряда аминокислотных остатков (например, Cys^5 , Phe^6 и Asn^{11}) значения $J_{\alpha\beta}$ (табл. 2) указывают на наличие одного преимущественного ротамера боковой цепи, но установить его по интенсивностям кросс-пиков ЯЭО не удастся, поскольку различные ротамеры характеризуются близкими значениями $F_{\text{ЯЭО}}^{\text{min}}$. Как показал модельный расчет локальной структуры ВРТИ [4], такая ситуация обусловлена идентичностью расстояний

* На первом месте приведена КССВ для β -протона с большим значением химического сдвига. В тех случаях, когда удалось провести стереохимическое отнесение сигналов β -протонов, подчеркнута значение КССВ для протона H^β .

** Возможные ротамеры боковой цепи определяли в соответствии с рис. 2. При этом предполагали, что протон H^δ находится в ориентации *gauche* относительно протона H^α (т. е. его можно идентифицировать как H^β на рис. 2), если его $J_{\alpha\beta} < 5$ Гц, и в ориентации *trans* (H^δ на рис. 2), если $J_{\alpha\beta} > 10$ Гц [4].

** Предполагали, что могут реализоваться ротамеры, которые согласуются с КССВ и при обоих значениях τ_m удовлетворяют критерию: $F_{\text{ЯЭО}}^{\text{min}} < \min\{F_{\text{ЯЭО}}^{\text{min}}(t), F_{\text{ЯЭО}}^{\text{min}}(g^+), F_{\text{ЯЭО}}^{\text{min}}(g^-)\} + 0,1$.

* КССВ не были измерены, поскольку химические сдвиги двух β -протонов близки [9].

** Судя по величине $J_{\alpha\beta}$ (6—9 Гц), в растворе происходит выравнивание населенностей ротамеров (см. обсуждение в [9]).

между протонами H^{β} и NH в различных конформациях боковой цепи, а также спиновой диффузией между β -протонами, приводящей к выравниванию интенсивностей кросс-пиков ЯЭО с участием β -протонов.

Конформации некоторых боковых цепей удается установить более однозначно, если при расчете учитывать интенсивности кросс-пиков ЯЭО между алифатическими протонами, а не только кросс-пиков с участием протонов NH . Например, в спектрах NOESY, полученных в работах [8, 9], для остатков Thr^7 и Thr^8 наблюдаются интенсивные кросс-пики ЯЭО $H_i^{\alpha}/C_j^{\gamma}H_3$, что с учетом величины $J_{\alpha\beta}$ (табл. 2) согласуется лишь с g^- -ротамером.

Следует отметить одну особенность анализа конформаций боковых цепей аминокислотных остатков белка по данным спектроскопии ЯМР. Для вычисления штрафной функции $F_{ЯЭО}$ необходимо провести стереохимическое отнесение сигналов β -протонов (для остатков с $C^{\beta}H_2$ -группой) и групп CH_3 (для остатков Leu и Val). В реализованной нами версии программного обеспечения рассматриваются все варианты стереохимического отнесения и автоматически выбирается тот из них, при котором штрафная функция минимальна (см. «Экспериментальную часть»). Однако этот вариант зависит от конформации боковой цепи. В тех случаях, когда конформация боковой цепи определяется однозначно, как правило, можно однозначно получить и стереохимическое отнесение. В частности, так и произошло для остатков Cys^2 , Asp^9 , Met^{12} , Cys^{16} , Arg^{17} , Cys^{19} и Cys^{31} , где реализуется ротамер t (табл. 2). В этом случае протон $H^{\beta t}$, которому отвечает более высокое значение $J_{\alpha\beta}$, стереохимически является протоном $H^{\beta 3}$, а характеризующийся меньшей КССВ $J_{\alpha\beta}$ протон $H^{\beta s} \equiv H^{\beta 2}$ (см. рис. 2). Для остатков Phe^{27} и Gln^{30} реализуется g^+ -ротамер и поэтому, наоборот, $H^{\beta t} \equiv H^{\beta 2}$, а $H^{\beta s} \equiv H^{\beta 3}$. В целом для 38% групп $C^{\beta}H_2$ инсектотоксина удалось получить стереохимическое отнесение сигналов β -протонов; оно указано в табл. 2. Зная стереохимическое отнесение сигналов от протонов, можно точнее задать систему дистанционных ограничений для последующего расчета всей пространственной структуры молекулы с помощью геометрического алгоритма и, следовательно, повысить точность ее определения (см. [6]).

Следует обратить внимание на величину функции $F_{ЯЭО}$ в ее глобальном минимуме (наименьшее из трех значений $F_{ЯЭО}^{min}$, приведенных в табл. 2 для ротамеров боковых цепей). Для большинства пептидных единиц инсектотоксина она не превышает 0,1 (табл. 2). В соответствии с уравнением (1) это означает, что среднее отклонение теоретических и экспериментальных интенсивностей составляет менее 10% от средней интенсивности кросс-пиков ЯЭО в пептидной единице, как это имело место и при модельном расчете локальной структуры ВРТИ [4]. Однако в отличие от модельного расчета ВРТИ для многих пептидных единиц инсектотоксина наименьшая величина $F_{ЯЭО}$ оказалась равной нулю из-за того, что все расчетные интенсивности $\bar{I}_k^{расч}$ попали в интервал $[\bar{I}_k^{эксп} - \delta_k; \bar{I}_k^{эксп} + \delta_k]$ (см. уравнение (1)). В этом случае увеличиваются диапазоны значений торсионных углов, в пределах которых удовлетворительно согласуются расчетные и экспериментальные интенсивности кросс-пиков ЯЭО. С другой стороны, для пептидных единиц Phe^6 , Lys^{15} , Gln^{30} и Cys^{33} соответствие расчетных и экспериментальных интенсивностей оказалось несколько хуже ($F_{ЯЭО}^{min} = 0,10-0,20$), чем при модельном расчете ВРТИ. Это может быть обусловлено как влиянием внутримолекулярной подвижности, так и ошибками в оценке погрешностей измерения интенсивностей кросс-пиков ЯЭО, которые в действительности могут быть больше, чем δ_k , найденные в окрестностях соответствующих кросс-пиков ЯЭО в спектрах NOESY.

Число остатков инсектотоксина, для которых не удалось однозначно установить доминирующий ротамер боковой цепи, несколько больше, чем в случае модельного расчета для ВРТИ [4]. Это обусловлено выравниванием в ряде случаев населенности ротамеров $S^{\alpha}-C^{\beta}$, отсутствием информации об интенсивностях некоторых кросс-пиков ЯЭО и влиянием

погрешностей измерения интенсивностей. Однако важно отметить, что невозможность определения или даже неправильное определение конформации боковой цепи практически не сказывается на точности определения торсионных углов φ и ψ [4].

Определение торсионных углов основной цепи φ_i и ψ_i . При расчете локальной структуры инсектотоксина определяли торсионные углы основной цепи φ_i и ψ_i , соответствующие глобальному минимуму функции $F_{ЯЭО}$ для каждой i -й пептидной единицы (φ_i^{\min} и ψ_i^{\min} в табл. 3) и оценивали диапазоны значений углов ($\Delta\varphi_i$ и $\Delta\psi_i$ в табл. 3), в пределах которых функция $F_{ЯЭО}$ меньше некоторой критической величины. При дальнейшем расчете пространственной структуры инсектотоксина с помощью Дистанционного геометрического алгоритма углы φ_i^{\min} и ψ_i^{\min} могут использоваться в качестве начального приближения, а диапазоны $\Delta\varphi_i$ и $\Delta\psi_i$ — как ограничения на величину торсионных углов.

Здесь, как и при оценке конформаций боковых цепей, независимо использовали три набора экспериментальных данных — интенсивности кросс-пиков ЯЭО, измеренные при двух значениях τ_m , и КССВ протонов $\text{H}-\text{NC}\alpha-\text{H}$ ($J_{N\alpha}$). Зависимости $F_{ЯЭО}(\varphi_i, \psi_i)$ (рис. 4–6), построенные при разных значениях τ_m , как правило, очень близки. Диапазоны $\Delta\varphi_i$ и $\Delta\psi_i$ выбирали таким образом, чтобы при обоих значениях τ_m выполнялось условие $F_{ЯЭО}(\varphi_i, \psi_i) < (F_{ЯЭО}^{\min} + \Delta F_{ЯЭО})$, где критерий отбора $\Delta F_{ЯЭО} = 0,1$, как и для ротамеров боковых цепей. Диапазоны $\Delta\varphi_i$ можно существенно уменьшить, если ограничиться лишь той их частью ($\Delta\varphi_i(J_{N\alpha})$ в табл. 3), которая согласуется с величиной $J_{N\alpha}$ (см. рис. 4–6). Следует отметить, что использованный здесь критерий $\Delta F_{ЯЭО} = 0,1$ несколько произволен, но позволяет получить результаты, согласующиеся со всеми имеющимися данными. Так, диапазоны $\Delta\varphi_i$ и $\Delta\psi_i$, определенные независимо при двух значениях τ_m , перекрываются между собой и попадают в стерически разрешенные области конформационной карты, а также согласуются с $J_{N\alpha}$ (см. рис. 4–6) и с известным расположением α -спиральных и β -структурных участков инсектотоксина [9].

Для всех остатков, кроме глицина, определена единственная область значений углов φ_i и ψ_i , в пределах которой функция $F_{ЯЭО}$ имеет достаточно низкое значение (см. рис. 4–6 и табл. 3). Размеры этой области существенно отличаются для разных остатков, что видно, например, при сравнении зависимостей $F_{ЯЭО}(\varphi_i, \psi_i)$ для пептидных единиц Cys⁵ (рис. 4) и Lys²⁵ (рис. 5). Диапазоны $\Delta\varphi_i$ и $\Delta\psi_i$ получились увеличенными для тех пептидных единиц, где из-за перекрывания в спектрах NOESY информация об интенсивностях некоторых кросс-пиков ЯЭО отсутствует. В среднем для тех остатков инсектотоксина, где проводили количественный анализ локальной структуры, диапазон $\Delta\varphi_i$ составляет 90°, $\Delta\psi_i$ — 93°, а $\Delta\varphi_i(J_{N\alpha})$ — 28°.

Для расчета торсионных углов φ_i , ψ_i и χ_i достаточно иметь хотя бы один интенсивный кросс-пик ЯЭО в составе пептидной единицы и располагать информацией об отсутствии в спектре нескольких кросс-пиков, как это имеет место, например, для Phe⁶ и Gln³⁰ (табл. 1). Однако расчет некорректен для тех пептидных единиц (Met³, Pro⁴ и Pro²⁹ инсектотоксина), все кросс-пики ЯЭО которых имеют низкую интенсивность, значительно превышающую уровень шума в спектре (табл. 1). В этом случае приходится рассматривать весь диапазон стерически разрешенных значений торсионных углов φ_i и ψ_i или приближенно оценивать конформацию пептидной единицы, сравнивая интенсивности ее кросс-пиков ЯЭО с интенсивностями кросс-пиков остатков с известной локальной структурой, например, остатков в α -спиральных и β -структурных участках молекулы.

Положения минимумов функции $F_{ЯЭО}(\varphi_i, \psi_i)$ (φ_i^{\min} , ψ_i^{\min} в табл. 3) могут несколько различаться при $\tau_m = 100$ и 200 мс, что обусловлено в основном разным соотношением интенсивностей кросс-пиков ЯЭО при разных значениях τ_m . Например, для пептидных единиц Met¹², Ala¹³ и Cys¹⁶, находящихся в области контакта α -спирали с β -структурой [9,

Диапазоны значений торсионных углов основной цепи φ_i и ψ_i ($\Delta\varphi_i$ и $\Delta\psi_i$), полученные при анализе локальной структуры инсектотоксина на основе интегральных интенсивностей кросс-пиков ЯЭО, измеренных при $\tau_m=100$ и 200 мс, и КССВ протонов $H-NC^{\alpha}-H$ ($J_{\alpha N}$)

$\Delta\varphi_i$ ($J_{\alpha N}$) — часть интервала $\Delta\varphi_i$, в пределах которого угол φ_i согласуется с величиной $J_{\alpha N}$. Углы φ_i^{\min} и ψ_i^{\min} соответствуют глобальному минимуму функции $F_{ЯЭО}(\varphi_i, \psi_i, \chi_i)$ для i -й пептидной единицы при τ_m 100 и 200 мс (в скобках)

Остаток	Диапазон значений угла, град *			φ_i^{\min} , град	ψ_i^{\min} , град
	$\Delta\varphi_i$	$\Delta\varphi_i$ ($J_{\alpha N}$)	$\Delta\psi_i$		
Met ¹			60÷180 ^{2*}		4*
Cys ²	-100÷-80	-90÷-80	-40÷0	-87(-70)	-33(-35)
Met ³	-180÷180 ^{4*}	-180÷-160	60÷180 ^{3*}	4*	4*
Pro ⁴			-30÷200 ^{2*}	4*	4*
Cys ⁵	-160÷-20	-140÷-100	60÷180	4*	4*
Phe ⁶	-200÷-120	-140÷-120	80÷160	-200(-160)	126(100)
Thr ⁷	-180÷-40	-180÷-160	-80÷40	-71(-80)	-2(20)
		-80÷-60			
Thr ⁸	-140÷-20	-110÷-80	-90÷60		
Asp ⁹	-140÷-20	-110÷-80	60÷180 ^{3*}	-80(4*)	4*
Pro ¹⁰			-30÷10		-15(-7)
Asn ¹¹	-160÷-60	-150÷-90	-80÷40	-100(-80) ^{4*}	-60(-40) ^{4*}
Met ¹²	-80÷-40	-60÷-40	-60÷-20	-68(-46)	-47(-48)
Ala ¹³	-100÷-40	-70÷-50	-80÷-20	-86(-71)	-36(-48)
Lys ¹⁴	-140÷-40	-80÷-60	-90÷40	-65(-56)	-48(-28)
Lys ¹⁵	-120÷-20	-70÷-60	-60÷40	-70(-80)	-20(-25)
Cys ¹⁶	-80÷-60	-80÷-60	-60÷-20	-74(-58)	-44(-55)
Arg ¹⁷	-80÷-60	-70÷-60	-60÷-20	-74(-65)	-34(-40)
Asp ¹⁸	-100÷-40	-70÷-60	-80÷-20	-63(-63)	-44(-40)
Cys ¹⁹	-120÷-60	-70÷-50	-80÷40	-76(-60) ^{4*}	-42(-40) ^{4*}
Cys ²⁰	-120÷-20	-90÷-70	-40÷40	-90(-60) ^{4*}	0 ^{4*}
Gly ^{21 5*}	-100÷-40	-70÷-90	-40÷40	-74(-42)	-5(-23)
Gly ^{22 5*}	-120÷-80	-120÷-100	-60÷20	-98(-110)	-8(20)
Asn ²³	-200÷-20	-150÷-90	80÷160	-120(-160) ^{4*}	120(120) ^{4*}
Gly ^{24 5*}	-180÷180	-180÷180	40÷320	180 ^{4*}	180 ^{4*}
Lys ²⁵	-200÷-120	-160÷-130	80:160	-159(-166)	140(145)
Cys ²⁶	-140÷-40	-100÷-80	80:160	-102(-100)	117(120)
Phe ²⁷	-140÷-100	-140÷-100	80÷140	-120(-105)	108(130)
Gly ^{28 5*}	-140÷-40	-80÷-60	-180÷180 ^{3*}	-80 ^{4*}	4*
Pro ²⁹			-90÷60 ^{2*}	4*	4*
Gln ³⁰	-120÷-20	-120÷-100	0÷160	-54(-53)	64(68)
Cys ³¹	-120÷-20	-110÷-80	60÷180	-72(-80)	141(120)
Leu ³²	-200÷-100	-140÷-100	0÷160	-120 ^{4*}	120 ^{4*}
Cys ³³	-140÷-60	-100÷-80	120÷160	-121(-90)	147(150)
Asn ³⁴	-120÷-20		0÷60	-100(4*)	30 ^{4*}
Arg ³⁵	-200÷-20			-120 ^{4*}	

1* $\Delta\varphi_i$ и $\Delta\psi_i$ — диапазоны значений углов φ_i и ψ_i , в пределах которых при обоих значениях τ_m (100 и 200 мс) выполняется условие: $F_{ЯЭО}(\varphi_i, \psi_i) < (F_{ЯЭО}^{\min} + 0,1)$, где $F_{ЯЭО}^{\min}$ — наименьшая величина штрафной функции для пептидной единицы при данном значении τ_m . Диапазоны $\Delta\varphi_i$ и $\Delta\psi_i$ кратны 20°, поскольку зависимости $F_{ЯЭО}(\varphi_i, \psi_i)$ строили с шагом 20°. Диапазоны $\Delta\varphi_i$ ($J_{\alpha N}$) округляли до 10°. Для Met³ и Thr⁷ приведены два диапазона $\Delta\varphi_i$ ($J_{\alpha N}$).

2* Диапазон определен путем качественного сравнения интенсивностей кросс-пиков ЯЭО (см. [4]).

3* Для остатков, расположенных перед пролином, указан диапазон стерически разрешенных значений угла ψ_i , поскольку не измеряли интенсивности кросс-пиков ЯЭО с участием протонов H_{i+1}^{δ} пролина, необходимые для оценки этого угла.

4* Минимум функции $F_{ЯЭО}$ не найден или плохо определен из-за отсутствия или недостаточного числа измеренных интенсивностей кросс-пиков ЯЭО. Углы φ_i^{\min} и ψ_i^{\min} , если они указаны, приблизительно соответствуют центру области, где функция $F_{ЯЭО}$ близка к нулю.

5* Диапазоны $\Delta\varphi_i$, $\Delta\psi_i$ и значения φ_i^{\min} , ψ_i^{\min} остатка Gly указаны для одной из двух областей, где выполняется условие $F_{ЯЭО}(\varphi_i, \psi_i) < (F_{ЯЭО}^{\min} + 0,1)$. Вторая область симметрична относительно точки $\varphi_i = 0$, $\psi_i = 0$.

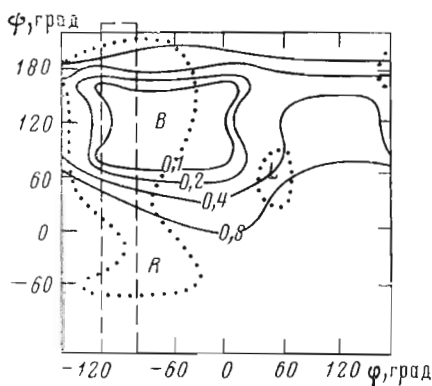


Рис. 4

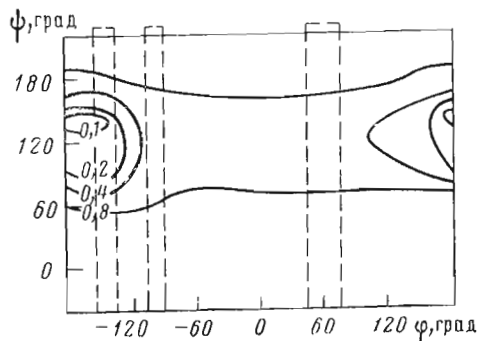


Рис. 5

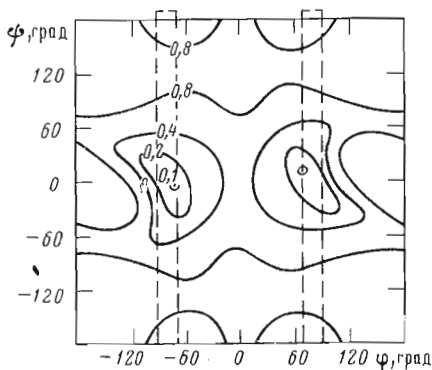


Рис. 6

Рис. 4. Карта $F_{ЯЭО}(\varphi_i, \psi_i)$ для пептидной единицы Cys⁵, построенная при $\tau_m = 100$ мс для ротамера g^+ ($\chi^1 = -60 \pm 30^\circ$). Штриховыми линиями ограничены области значений угла φ_i , согласующиеся с КССВ протонов $H-NC^\alpha-H$ (см. работу [11] и «Экспериментальную часть»). Пунктиром ограничены низкоэнергетические области R , B и L конформационной карты $\varphi - \psi$ для пептидной единицы аланина

Рис. 5. Карта $F_{ЯЭО}(\varphi_i, \psi_i)$ для g^+ -ротамера ($\chi^1 = -60 \pm 30^\circ$) пептидной единицы остатка Lys²⁵, построенная при $\tau_m = 100$ мс. Штриховыми линиями ограничены области значений угла φ_i , согласующиеся с КССВ протонов $H-NC^\alpha-H$

Рис. 6. Карта $F_{ЯЭО}(\varphi_i, \psi_i)$ для пептидной единицы остатка Gly²¹, построенная при $\tau_m = 100$ мс. Штриховыми линиями ограничены области значений угла φ_i , согласующиеся с КССВ протонов $H-NC^\alpha-H$. Карта симметрична относительно точки $\varphi_i = 0$, $\psi_i = 0$

10], при увеличении τ_m интенсивность кросс-пика NH_i/NH_{i+1} уменьшается, а всех остальных кросс-пиков ЯЭО возрастает (табл. 1). Это, по-видимому, связано с усилением при $\tau_m = 200$ мс переноса намагниченности с протонов NH_i и NH_{i+1} на окружающие протоны белка, не входящие в состав соответствующих пептидных единиц, с которыми протоны NH_i и NH_{i+1} образуют ряд интенсивных кросс-пиков ЯЭО.

Заключение

Итак, расчет локальной структуры инсектотоксина I_5A *B. eupreus*, проведенный на основе интегральных интенсивностей кросс-пиков ЯЭО и КССВ протонов $H-NC^\alpha-H$ и $H-C^\alpha C^\beta-H$, позволил определить торсионные углы основной цепи молекулы с точностью до некоторого диапазона значений, составляющего в среднем соответственно 28 и 93° для углов φ и ψ . Величина диапазонов для каждого конкретного остатка зависит в первую очередь от полноты экспериментальных данных, т. е. от числа идентифицированных непрерывных кросс-пиков ЯЭО в спектрах

NOESY, для которых удалось измерить интенсивность. Ротамер боковой цепи, характеризующийся величиной торсионного угла χ^1 , однозначно определен для 42% аминокислотных остатков инсектотоксина (исключая остатки Gly, Ala и Pro), а для 46% остатков выявлено два возможных ротамера. Полученные значения торсионных углов согласуются с второй структурой инсектотоксина, установленной ранее по данным спектроскопии ЯМР, и могут служить исходными данными для расчета пространственной структуры молекулы.

Экспериментальная часть

Спектры NOESY снимались для 5 мМ водного раствора инсектотоксина I₃A *B. eupreus* при 30° С и рН 3,2 для времен обмена компонент намагниченности τ_m 100 и 200 мс. Временной интервал между импульсными последовательностями для достижения равновесного состояния ядерной намагниченности $D1$ был выбран равным 1,5 с, а время детектирования сигнала t_2 0,4 с. Преобразование Фурье для получения фазоизбирательных спектров NOESY выполнено при помощи программы DISR861 Bruker (ФРГ). Цифровое разрешение в 2D-спектрах ¹H-ЯМР составляло 9,77 и 2,44 Гц на точку по оси ω_1 и ω_2 соответственно. Коррекцию базовой плоскости 2D-спектра проводили как в работе [13]. Объемы кросс-пиков измеряли путем интегрирования в области спектра, задаваемой прямоугольником, при помощи стандартной подпрограммы, имеющейся в программе DISR861. Для оценки погрешности измерения объема кросс-пика δ_k проводили интегрирование в пустой области спектра, задаваемой тем же прямоугольником в непосредственной близости от измеренного кросс-пика.

Времена неселективной спин-решеточной релаксации протонов T_1 , необходимые для расчета интенсивностей кросс-пиков ЯЭО [4], измеряли в одномерных ¹H-ЯМР-спектрах методом «инверсия-восстановление» [14]. Времена T_1 были измерены для каждого протона NH инсектотоксина и лежат в диапазоне от 0,8 до 1,4 с для протонов NH в основной цепи и от 0,4 до 0,8 с в боковых цепях аминокислотных остатков инсектотоксина. Ошибка во временах T_1 незначительно сказывается на расчетных интенсивностях кросс-пиков ЯЭО [15]. Поэтому в тех случаях, когда из-за перекрывания сигналов в одномерном спектре ¹H-ЯМР трудно измерить время релаксации индивидуальных протонов, использовали времена, характерные для различных типов протонов: 0,6 с — для протонов H^β и метильных групп, 0,9 с — для H^α и 1,1 с — для остальных.

Матрицу интенсивностей кросс-пиков ЯЭО $I(\tau_m)$ рассчитывали с учетом взаимодействия всех N протонов в пептидной единице по уравнению [16—18]:

$$I(\tau_m) = \exp(-R\tau_m) I_0 = D \exp(-\Lambda\tau_m) D^{-1} I_0, \quad (2)$$

где R — матрица релаксации; D — матрица собственных векторов матрицы R ; Λ — диагональная матрица, содержащая собственные значения матрицы R ; I_0 — диагональная матрица, описывающая состояние спиновой системы перед началом импульсной последовательности NOESY.

Каждый диагональный элемент матрицы релаксации R (например, ρ_p) представляет собой скорость переноса намагниченности с соответствующего p -го ядра, а недиагональный элемент σ_{pq} — скорость кросс-релаксации между ядрами p и q . В интересующем нас случае белков и больших пептидов (при отрицательных значениях ЯЭО) скорости ρ_p определяются выражением [19]:

$$\rho_p = 1/T_{1p} - \sum_{q=1}^N \sigma_{p,q}, \quad (3)$$

где T_{1p} — экспериментально измеренное время спин-решеточной релаксации p -го ядра при неселективном возбуждении спиновой системы.

Скорости кросс-релаксации σ_{pq} между неметильными протонами рассчитывали по формуле [20]:

$$\sigma_{pq} = -(\gamma^4 \hbar^2 / 10 r_{pq}^6) \tau_c, \quad (4)$$

где γ — гиромагнитное отношение для протонов; \hbar — постоянная Планка; r_{pq} — расстояние между протонами p и q ; τ_c — время корреляции движения вектора r , которое обычно принимают равным времени корреляции вращения белковой глобулы. Для вычисления скоростей кросс-релаксации с участием протонов метильных групп использовали модель быстрых скачков между тремя дискретными состояниями метильной группы в изотропно вращающейся молекуле [21].

Неравновесность исходного состояния системы спинов (равновесие достигается при условии, что $(t_2 + D1) > 5T_{1p}$) учитывали при вычислении элементов диагональной матрицы I_0 по формуле [15]:

$$I_{pp}^0 = 1 - \exp[-(t_2 + D1)/T_{1p}]. \quad (5)$$

При вычислении функции ошибок $F_{ЯЭО}$ по уравнению (1) учитывали и суммарные кросс-пики ЯЭО, образованные парами протонов, принадлежащих одной пептидной единице. Такие кросс-пики встречаются сравнительно часто (см. табл. 1), поскольку для многих остатков инсектотоксина химические сдвиги обоих β - или γ -протонов близки или совпадают. В этом случае интенсивность $I_k^{\text{расч}}$ в уравнении (1) определяли как сумму соответствующих вкладов (элементов матрицы I) $I_{pq}^{\text{расч}}$, рассчитанных по уравнениям (2—5):

$$I_k^{\text{расч}} = \sum_{p, q} I_{pq}^{\text{расч}}. \quad (6)$$

Если пептидные единицы включают в себя группировки CH_2 , NH_2 и $(\text{CH}_3)_2$ с неоднозначным стереохимическим отнесением сигналов, то функцию $F_{ЯЭО}$ вычисляли при всех возможных 2^K вариантах стереохимического отнесения K группировок и выбирали такой вариант, при котором функция минимальна:

$$F_{ЯЭО} = \min \{F_{ЯЭО}^{(1)}, F_{ЯЭО}^{(2)}, \dots, F_{ЯЭО}^{(s)}, \dots, F_{ЯЭО}^{(2^K)}\}_{\min} \quad (7)$$

где $F_{ЯЭО}^{(s)}$ — величина функции при s -м варианте отнесения, вычисленная по уравнению (1). По существу именно такой подход мы использовали ранее при расчете пространственной структуры грамицидина А [22]. Однако для рассмотренных пептидных единиц инсектотоксина $K \leq 2$, и поэтому не было необходимости разбивать все множество группировок с неоднозначным стереохимическим отнесением на подмножества с взаимосвязанным отнесением, как это делали для всей молекулы в работе [22].

Методика построения зависимостей $F_{ЯЭО}(\varphi_i, \psi_i)$ и поиска глобального минимума $F_{ЯЭО}$ для пептидных единиц описана в работе [4]. Значения торсионных углов φ_i , удовлетворяющие величине $J_{N\alpha}$, определяли по стереохимической зависимости $J_{N\alpha}(\varphi_i)$ [11]. Предполагали, что при заданном угле φ_i величина $J_{N\alpha}$ может лежать в диапазоне от $\min \{J_{N\alpha}(\varphi_i) - \Delta, J_{N\alpha}(\varphi_i) + \Delta\}$ до $\max \{J_{N\alpha}(\varphi_i) + \Delta, J_{N\alpha}(\varphi_i) - \Delta\}$, где $J_{N\alpha}(\varphi_i)$ и $J_{N\alpha}(\varphi_i) - \text{KССВ}$, рассчитанные соответственно без учета и с учетом динамического усреднения, а Δ — погрешность измерения КССВ, равная 0,5 Гц. При этом динамическое усреднение КССВ проводили в предположении равной вероятности всех значений, лежащих в интервале $\pm 30^\circ$ относительно указанного значения угла φ_i .

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wuthrich K. // NMR of proteins and nucleic acids. N. Y.: Wiley, 1986.
2. Bystrov V. F. // Soviet Scientific Reviews. D. Physicochemical Biology Reviews. V. 5/Ed. Sculachev V. P. Amsterdam: Harwood Acad. Publ., 1984. P. 207—275.
3. Саулитис Ю. В., Лиениньш Э. Э. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 2. С. 168—176.
4. Ложизе А. Л., Соболев А. Г., Арсеньев А. С. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 2. С. 179—201.

5. Arseniev A. S., Shultze P., Worgotter E., Braun W., Wagner G., Vasak M., Kagi J. H. R., Wuthrich K. // J. Mol. Biol. 1988. V. 201. № 3. P. 637—657.
6. Guntert P., Braun W., Billeter M., Wuthrich K. // J. Amer. Chem. Soc. 1989. V. 111. № 11. P. 3997—4004.
7. Гришин Е. В., Волкова Т. М., Солдатова Л. П. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 2. С. 155—164.
8. 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.
9. Арсеньев А. С., Кондаков В. И., Майоров В. Н., Быстров В. Ф., Овчинников Ю. А. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 12. С. 1667—1689.
10. Arseniev A. S., Kondakov V. I., Maiorov V. N., Bystrov V. F. // FEBS Lett. 1984. V. 165. № 1. P. 57—62.
11. Bystrov V. F. // Progress in NMR spectrosc. 1976. V. 10. Part 1. P. 41—81.
12. IUPAC—IUB Commission on Biochemical Nomenclature // Biochim. et biophys. acta. 1971. V. 229. № 1. P. 1—17.
13. Barsukov I. L., Arseniev A. S. // J. Magn. Res. 1987. V. 73. № 1. P. 148—149.
14. Vold R. L., Waugh J. S., Klein M. P., Phelps D. E. // J. Chem. Phys. 1968. V. 48. № 8. P. 3831—3832.
15. Соболев А. Г., Арсеньев А. С. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 8. С. 997—1013.
16. Keepers J. W., James T. L. // J. Magn. Reson. 1984. V. 57. № 3. P. 404—426.
17. Bodenhausen G., Ernst R. R. // J. Amer. Chem. Soc. 1982. V. 104. № 5. P. 1304—1309.
18. Bremer J., Mendz G. L., Moore W. J. // J. Amer. Chem. Soc. 1984. V. 106. № 17. P. 4691—4696.
19. Macura S., Ernst R. R. // Mol. Phys. 1980. V. 41. № 1. P. 95—117.
20. Kalk A., Berendsen H. J. C. // J. Magn. Reson. 1976. V. 24. № 3. P. 343—366.
21. Tropp J. J. // J. Chem. Phys. 1980. V. 72. № 11. P. 6035—6043.
22. Арсеньев А. С., Ломизе А. Л., Барсуков И. Л., Быстров В. Ф. // Биол. мембраны. 1986. Т. 3. № 11. С. 1077—1104.

Поступила в редакцию
3.I.1990

A. L. LOMIZE, A. S. ARSENIYEV, I. V. MASLENNIKOV, V. F. BYSTROV

THE LOCAL STRUCTURE OF A PROTEIN INSECTOTOXIN I₅A FROM *BUTHUS EUPEUS* DETERMINED FROM ¹H NMR DATA

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

The local structure (torsion angles φ , ψ and χ^1 of amino acid residues) of insectotoxin I₅A (35 residues) of scorpion *Buthus eupeus* has been determined from cross-peak integral intensities in two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (NOESY) spectra and spin coupling constants of vicinal H—NC^α—H and H—C^αC^β—H protons. The local structure determination was carried out by fitting complete relaxation matrix of peptide unit protons (protons of a given residue and NH₂ proton of the next residue in the amino acid sequence) with experimental NOESY cross-peak intensities. The obtained intervals of backbone torsional angles φ and ψ consistent with NMR data were determined for all but Gly residues. The predominant C^α—C^β rotamer of the side chain has been unambiguously determined for 42% of the insectotoxin amino acid residues whereas for another 46% residues experimental data are fitted equally well with two rotamers. Stereospecific assignments were obtained for 38% of β -methylene groups. The determined torsional angles φ , ψ and χ^1 correspond to the sterically allowed conformations of the amino acid residues and agree with the insectotoxin secondary structure established earlier by ¹H NMR spectroscopy.