



УДК 577.322.5 : 577.112.012.6 : 543.422.25

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

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ
ИНСЕКТОТОКСИНА I5A *BUTHUS EUROPEUS* ПО ДАННЫМ
СПЕКТРОСКОПИИ $^1\text{H-NMR}$

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

По данным спектроскопии $^1\text{H-NMR}$ определена пространственная структура инсектотоксина I5A скорпиона *Buthus eupeus*, состоящего из 35 аминокислотных остатков и содержащего четыре дисульфидные связи, система замыкания которых не была установлена химическими методами. В качестве вводных данных использованы 386 контактов ядерного эффекта Оверхаузера и 113 ограничений на торсионные углы φ , ψ и χ^1 полипептидной цепи, полученных в результате ранее проведенного анализа локальной структуры молекулы. Кроме того, использованы данные по дейтерообмену амидных протонов NH. Расчеты проведены с помощью дистанционного геометрического алгоритма (программа DIANA) с последующим энергетическим уточнением (программа CHARMM). Получен набор из 20 низкоэнергетических конформаций, удовлетворяющих наложенным экспериментальным ограничениям. Среднеквадратичное расхождение по координатам составило $0,64 \pm 0,11 \text{ \AA}$ для атомов основной цепи и $1,35 \pm 0,20 \text{ \AA}$ для всех неводородных атомов. Пространственная структура инсектотоксина включает в себя α -спираль $\text{Pro}^{10} - \text{Cys}^{20}$ и антипараллельную β -структуру из трех тяжей: $\text{Cys}^2 - \text{Cys}^5$, $\text{Gly}^{24} - \text{Gly}^{28}$ и $\text{Pro}^{29} - \text{Cys}^{33}$. При расчете однозначно идентифицированы две дисульфидные связи инсектотоксина ($\text{Cys}^2 - \text{Cys}^{19}$ и $\text{Cys}^{20} - \text{Cys}^{33}$), а две другие ($\text{Cys}^5 - \text{Cys}^{26}$ и $\text{Cys}^{16} - \text{Cys}^{31}$) определены на основании результатов расчета и структурной аналогии с гомологичными инсектотоксину I5A «короткими» и «длинными» токсинами скорпиона, характеризующимися одинаковым взаимным расположением α -спирали и β -структуры.

Полипептидные токсины скорпиона, действующие на млекопитающих, насекомых и ракообразных, можно разделить на структурные группы «коротких» и «длинных» токсинов, состоящих соответственно из 31–37 и 60–75 аминокислотных остатков [1–8]. Внутри каждой группы степень гомологии аминокислотных последовательностей колеблется приблизительно от 20 до 90%. Для «коротких» токсинов (рис. 1) можно выделить три подгруппы: 1) инсектотоксины I1 и I5A *Buthus eupeus* [2] и токсин P2 *Androctonus mauretanicus* [3]; 2) чарибдотоксин *Leiurus quinquestriatis hebraeus* [4–6] иноксустоксин *Centruroides noxius* [7]; 3) лейуротоксин *Leiurus quinquestriatis hebraeus* [8]. Внутри первой и второй подгрупп гомология составляет соответственно 64–73 и 45%, а между «короткими» и фрагментом «длинного» токсина v-3 – 19–29% (табл. 1). Все токсины содержат три инвариантные дисульфидные связи (рис. 1), установленные химическим путем для «длинных» токсинов и чарибдотоксина [1, 6].

Исследование пространственной структуры «длинных» и «коротких» токсинов скорпиона с помощью рентгеноструктурного анализа [9, 10] и двумерной спектроскопии $^1\text{H-NMR}$ [5, 8, 11–16] показало, что все эти белки характеризуются сходной укладкой полипептидной цепи, включающей в себя α -спираль и антипараллельную β -структуру. При этом токсины существенно различаются по своей биологической активности. «Длинные» токсины действуют на потенциалзависимые натриевые каналы нервных клеток [1], инсектотоксин I5A – на глутаматный рецептор постсинаптической мембраны [2], чарибдотоксин и лейуротоксин блоки-

Использованные сокращения: ЯЭО – ядерный эффект Оверхаузера; СКР – среднеквадратичное расхождение координат атомов.

Гомология (%) между «короткими» токсинами скорпионов и фрагментом Cys¹⁶-Cys⁴⁸ «длинного» токсина v-3

Токсин *	I5A	I1	P2	Ch	No	Le
I1	73					
P2	70	64				
Ch	28	27	27			
No	22	24	19	45		
Le	27	27	27	29	26	
v-3	20	23	20	20	19	24

* Обозначения токсинов — см. подпись к рис. 1.

Классификация ограничений на расстояния между протонами по экспериментальным данным ЯЭО, использованная при определении пространственной структуры инсектотоксина I5A

Тип контакта	τ_m , мс *	Интенсивность кросс-пика ЯЭО	Ограничение сверху, Å
1	100	Высокая	2,8
2	100	Средняя	3,2
3	100	Низкая	3,8
4	200	Любая	4,2
5	300	»	5,0

* τ_m — наименьшее время обмена компонент намагниченности, при котором кросс-пик наблюдается в спектре NOESY (в эксперименте использовались $\tau_m=100, 200$ и 300 мс). При $\tau_m=100$ мс интенсивность кросс-пиков оценивали визуально, как в работе [13].

руют Ca²⁺-зависимые и потенциалзависимые калиевые каналы [4–6, 8], ноксиустокин, по-видимому, тоже влияет на калиевую проводимость [7], а биологическая активность токсинов I1 и P2 не исследована.

Инсектотоксин I5A скорпиона *V. equirex* был детально изучен методами 2D-¹H-ЯМР [12, 13]. На основе полученных экспериментальных данных (ядерных эффектов Оверхаузера (ЯЭО), констант спин-спинового взаимодействия (КССВ) и времен дейтеробмена амидных протонов) проводилось моделирование пространственной структуры молекулы с помощью дистанционного геометрического алгоритма [17–18] в упрощенном представлении, где каждый аминокислотный остаток аппроксимировали двумя обобщенными атомами. В результате было установлено, что полипептидная цепь молекулы образует β -изгиб Asp⁹-Met¹², α -спираль Met¹²-Gys¹⁹ и двухтяжевую β -структуру Asn²³-Asn³⁴ с β -изгибом Phe²⁷-Gln³⁰ [13–15]. Пространственная структура фрагмента α -спирали (Ala¹³-Cys¹⁹) была определена с помощью дистанционного геометрического алгоритма в полном атомном представлении [16]. В дальнейшем по интенсивностям кросс-пиков ЯЭО, наблюдаемым между протонами каждого i -го остатка и амидным протоном NH_{*i+1*} следующего за ним $i+1$ -го остатка, была определена локальная структура инсектотоксина I5A, т. е. оценены торсионные углы ϕ , ψ и χ^1 каждого аминокислотного остатка [19]. В настоящей работе приведены результаты расчета пространственной структуры инсектотоксина I5A в полном атомном представлении на основе всех имеющихся данных ЯМР и предшествующего анализа локальной структуры.

МЕТОДИКА РАСЧЕТА

Расчет пространственной структуры инсектотоксина I5A проведен в соответствии с блок-схемой, изображенной на рис. 2. Основной ее элемент — программа DIANA [20], реализующая одну из версий дистанционного геометрического алгоритма. Вводными данными являются ограничения на расстояния для контактов ЯЭО, водородных и дисульфидных связей, ограничения на торсионные углы, а также информация о стереохимическом отнесении атомов и метильных групп (рис. 2). Программа DIANA случайным образом генерирует стартовые конформации молекулы, а затем минимизирует в пространстве торсионных углов полипептидной цепи штрафную функцию, включающую в себя ограничения на межатомные расстояния и торсионные углы [20]. При этом в штрафную функцию включаются лишь ограничения для остатков, разность номеров которых не превышает некоторой заданной величины ρ [20]. Оптимизация каждой стартовой конформации проводится последовательно для

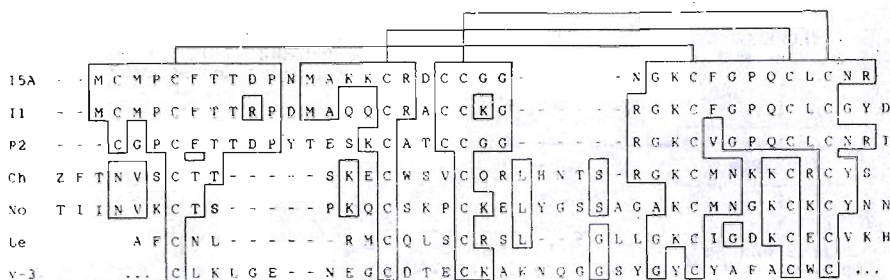


Рис. 1. Сравнение аминокислотных последовательностей «коротких» токсинов скорпиона (инсектотоксинов 11 и 15А среднеазиатского скорпиона *B. eupeus* [2], токсина P2 африканского скорпиона *Androctonus mauretanicus* [3], чарибдотоксина (Ch) и лейуротоксина (Le) израильского скорпиона *Leiurus quinquestriatus hebraeus* [4, 8] и нокустотоксина (No) скорпиона *Centruroides noxius* [7]) и фрагмента Cys¹⁶-Cys⁴⁸ «длинного» токсина v-3 скорпиона *Centruroides sculpturatus*. Указаны дисульфидные связи, определенные химическими методами для чарибдотоксина [6] и «длинных» токсинов [1]. Совмещение аминокислотных последовательностей проводилось с учетом кристаллографической структуры токсина v-3 [9] и вторичной структуры «коротких» токсинов, установленной по данным ЯМР [5, 8, 13]

$\rho=1, 2, 3 \dots n$ (n — число остатков в молекуле). Весовые коэффициенты вкладов в штрафную функцию полагали равными 1 для экспериментальных ограничений, 0,2 для стерических ограничений, 5 \AA^2 для ограничений на торсионные углы. На завершающей стадии оптимизации ($\rho=35$) весовые коэффициенты первых двух вкладов принимали равными 0,6 и 2,0 соответственно.

Исходная система ограничений на межатомные расстояния была сформирована из 386 контактов ЯЭО, идентифицированных в 2D-спектрах ¹H-ЯМР. На рис. 3 представлены распределения числа контактов ЯЭО в зависимости от номера остатка и протяженности сегмента полипептидной цепи ρ между остатками, включающими в себя контактирующие атомы. Контакты ЯЭО были разбиты на пять классов в зависимости от интенсивности кросс-пиков и времени τ_m (см. табл. 2). Ограничения на торсионные углы были установлены в соответствии с результатами работы [19] по определению локальной структуры инсектотоксина 15А (табл. 3). Для боковых цепей при расчете локальной структуры определяли возможные ротамеры (табл. 4), а не непосредственно диапазоны значений, как для углов основной цепи ϕ и ψ [19]. Поэтому для углов χ^1 эти диапазоны соответствовали равновесным для ротамеров значениям $(-60, 60, 180^\circ) \pm 30^\circ$. Кроме того, учитывали полученное при анализе локальной структуры стереохимическое отнесение β -метиленовых протонов (табл. 4).

После расчета набора конформаций с помощью программы DIANA проводился детальный анализ этого набора с тем, чтобы уточнить ограничения на межатомные расстояния и торсионные углы, а также стереохимические отнесения атомов, а затем расчет повторялся снова (рис. 2). При анализе набора конформаций прежде всего идентифицировали систематические нарушения контактов ЯЭО, чтобы выявить неправильно отнесенные контакты, а также проверить величины ограничений, заданных для контактов разного типа (табл. 2). Затем для амидных групп NH, характеризующихся большими (≥ 40 ч) временами дейтерообмена, определяли сближенные с ними в пространстве акцепторные группы CO (табл. 5), после чего вводили соответствующие ограничения на расстояния N...O (1,8–2,0 Å) и N...O (2,7–3,0 Å) для водородных связей.

В дальнейшем анализировали взаимосвязь между небольшими (0,3–0,4 Å) нарушениями контактов ЯЭО с участием протонов боковых цепей и конформациями этих боковых цепей, наблюдаемыми в полученном наборе структур молекулы. Для некоторых остатков наблюдаемые значения торсионных углов χ^1 и χ^2 отчетливо распадались на несколько конформаций, в одной из которых ЯЭО-контакты нарушались. Эту конформацию боковой цепи исключали введением дополнительных ограничений на углы χ^1 и χ^2 (см. рис. 2 и табл. 3). Так, например, на одном из про-

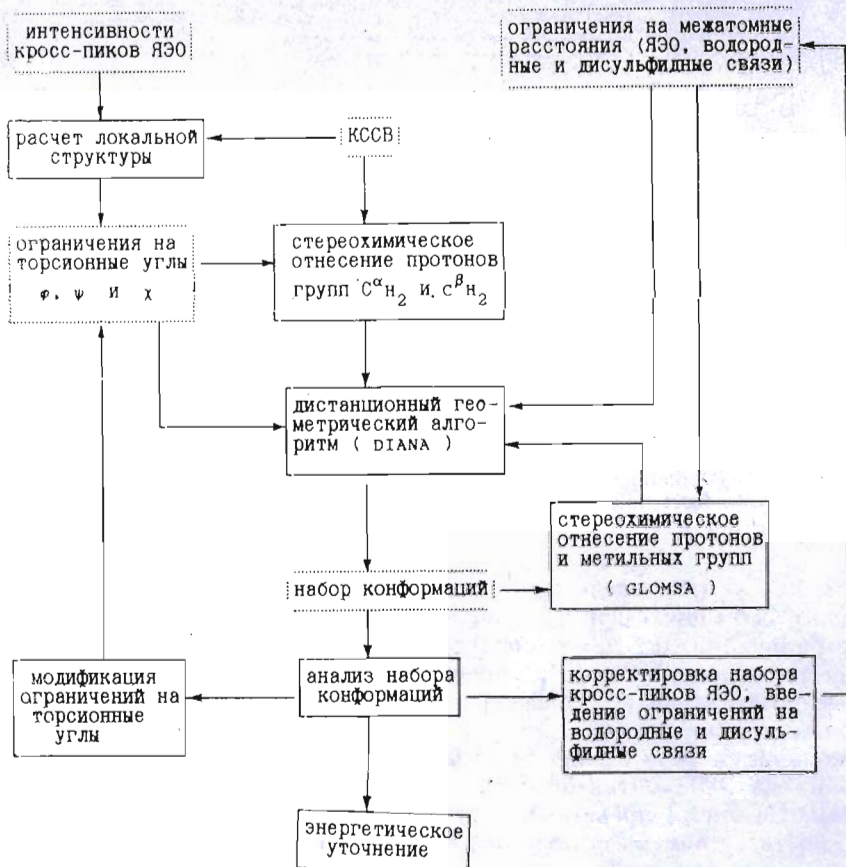


Рис. 2. Блок-схема процедуры расчета пространственной структуры инсектотоксина 15А

межзвучных этапов расчета во всех 30 полученных конформациях молекулы угол χ^2 боковой цепи остатка Met¹² попадал только внутрь двух достаточно узких интервалов 47–55° или –87÷–66°, причем в первом случае несколько кросс-пиков ЯЭО боковой цепи Met¹² неизменно нарушались, а во втором – нет. Поэтому было введено ограничение на угол χ^2 Met¹², отвечающее ротамеру $\chi^2 = -60^\circ$ (табл. 3).

Стереохимическое отнесение протонов C^αH₂ и C^βH₂ определяли независимо двумя способами: по КССВ протонов Н – C^αC^β – Н и с помощью программы GLOMSA [20]. В первом случае стереохимическое отнесение метиленовых протонов задавалось для тех остатков, где после расчета набора конформаций программой DIANA однозначно определился ротамер боковой цепи по углу χ^1 (180±30 или –60±30°) или торсионный угол φ глицина и две КССВ значительно отличались друг от друга, т. е. один из α- или β-протонов находился в ориентации *гош*, а другой – в ориентации *транс* по отношению к протону NH или H^α. Например, при χ^1 , близком к –60°, *транс*-ориентированный β-протон с большей КССВ стереохимически является протоном H^{β2}, а при χ^1 , близком к 180°, – протоном H^{β3}. Указанные условия выполнялись для двух остатков глицина (Gly²² и Gly²⁸) и для 11 из 28 остатков инсектотоксина, имеющих группы C^βH₂ (табл. 4). Когда же химические сдвиги β-протонов совпадали (Asp¹⁸, Lys²⁵ и Pro²⁹) или наблюдались динамически усредненные КССВ (Asn²³, Asn³⁴ и Arg³⁵) [13], естественно, нельзя было определить стереохимическое отнесение.

Программа GLOMSA [20] позволяет определить варианты стереохимического отнесения метиленовых групп и пар групп CH₃ (для остатков Val и Leu), наилучшим образом согласующиеся с экспериментальными ограничениями на расстояния между атомами для набора полученных

Ограничения на торсионные углы ϕ и ψ основной и χ^1 и χ^2 боковых цепей, использованные при определении пространственной структуры инсектотоксина 15A*

Остаток	Диапазоны торсионных углов, град			
	ϕ	ψ	χ^1	χ^2
Met ¹		60 - 180	30 - 90	
Cys ²	-90 ÷ -80	-40 - 0	150 - 210	
Met ³	-180 ÷ -70	60 - 180	30 - 90	
Pro ⁴		-30 - 200		
Cys ⁵	-140 ÷ -100	60 - 180	-210 ÷ -30	
Phe ⁶	-140 ÷ -120	80 - 160	-90 ÷ -30	
Thr ⁷	-180 ÷ -60	-80 - 40	30 - 90	
Thr ⁸	-110 ÷ -80	-90 - 60	30 - 210	
Asp ⁹	-110 ÷ -80	60 - 180	150 - 210	
Pro ¹⁰		-30 - 10		
Asn ¹¹	-150 ÷ -90	-80 - 40	150 - 210	
Met ¹²	-60 ÷ -40	-60 ÷ -20	150 - 210	-90,0 ÷ -30,0
Ala ¹³	-70 ÷ -50	-80 ÷ -20		
Lys ¹⁴	-80 ÷ -60	-90 - 40		
Lys ¹⁵	-70 ÷ -60	-60 - 40	-210 ÷ -30	
Cys ¹⁶	-80 ÷ -60	-60 ÷ -20	150 - 210	
Arg ¹⁷	-70 ÷ -60	-60 ÷ -20	150 - 210	
Asp ¹⁸	-70 ÷ -60	-80 ÷ -20	-210 ÷ -30	
Cys ¹⁹	-70 ÷ -50	-80 - 40	150 - 210	
Cys ²⁰	-90 ÷ -70	-40 - 40	-210 ÷ -30	
Gly ²¹	70 - 90	-40 - 40		
Gly ²²	100 - 120	-20 - 60		
Asn ²³	-150 ÷ -90	80 - 160		
Gly ²⁴		40 - 320		
Lys ²⁵	-160 ÷ -130	80 - 160	-90 - 90	
Cys ²⁶	-100 ÷ -80	80 - 160	-210 ÷ -30	
Phe ²⁷	-140 ÷ -100	80 - 140	-90 ÷ -30	
Gly ²⁸	60 - 80			
Pro ²⁹		-90 - 60		
Gln ³⁰	-120 ÷ -100	0 - 160	-90 ÷ -30	
Cys ³¹	-110 ÷ -80	60 - 180	150 - 210	
Leu ³²	-140 ÷ -100	0 - 160	-90 ÷ -30	
Cys ³³	-100 ÷ -80	120 - 160	-210 ÷ -30	
Asn ³⁴	-120 ÷ -20	0 - 60		

* Все ограничения были получены при расчете локальной структуры инсектотоксина [19], однако некоторые из них (подчеркнуты) были дополнительно уменьшены, чтобы исключить нарушения кросс-пиков ЯЭО с участием протонов боковых цепей, появляющиеся в части конформаций, рассчитанных программой DIANA (см. рис. 2 и «Методику расчета»). Для остатков глицина после расчета локальной структуры [19] были определены две области значений ϕ и ψ , симметричные относительно точки $\phi=0^\circ$ и $\psi=0^\circ$, однако затем при расчете первого набора конформаций инсектотоксина программой DIANA выяснилось, какая из этих двух областей реализуется в действительности. Поэтому в дальнейшем использовались диапазоны значений ϕ и ψ , соответствующие только одной из этих областей. Ограничения на двугранный угол ϕ введены с учетом КССВ протонов $H-N^{\alpha}C-H$, а на χ^1 отвечают равновесным значениям угла для трех возможных ротамеров ($-60, 180$ и 60°) $\pm 30^\circ$ или объединению соответствующих диапазонов для нескольких возможных ротамеров.

при расчете конформаций молекулы (рис. 2). Варианты отнесения, установленные с помощью программы GLOMSA (табл. 4 и 6) и по КССВ, полностью согласуются, что свидетельствует о достаточной надежности получаемых результатов. В конечном счете стереохимическое отнесение было определено для всех четырех групп $C^{\alpha}H_2$ остатков глицина, для 15 из 25 групп $C^{\beta}H_2$, в которых β -протоны имеют разные химические сдвиги, для 3 из 9 групп $C^{\gamma}H_2$ и для 3 из 10 групп $C^{\delta}H_2$ (считая и группировку $(C^{\delta}H_2)_2$ остатка Leu³²).

После уточнения системы контактов ЯЭО, введения ограничений на водородные связи и дополнительных ограничений на торсионные углы и определения стереохимических отнесений проводился анализ пространственной близости остатков цистеина и затем для нескольких возможных систем дисульфидных связей расчет с дополнительно введенными

Константы спин-спинового взаимодействия (КССВ) протонов $H-C^{\alpha}C^{\beta}-H$ (из [13]), конформации боковых цепей относительно связи $C^{\alpha}-C^{\beta}$ (торсионный угол χ^i) и стереохимическое отнесение сигналов β -протонов инсектотоксина I5A

Остаток	КССВ $H-C^{\alpha}C^{\beta}-H, \Gamma_{\alpha}^*$	Ротамеры ^{2*}		Отнесение ^{3*}	
		локальная структура [15]	DIANA	по КССВ	GLOMSA
Met ¹	4,6; 4,6	g^-	g^-		-
Cys ²	4,3; 10,5	t	t	+	+
Met ³	3,5; 3,5	g^-	g^-		
Pro ⁴	6,3; 8,5				
Cys ⁵	12,2; 2,7	g^+, t	g^+, t		+
Phe ⁶	3,6; 11,4	g^+, t	g^+	-	-
Thr ⁷	3,5	g^-, t	g^-		
Thr ⁸	2,0	g^-, t	g^-, t		
Asp ⁹	12,2; 3,6	t	t	-	-
Pro ¹⁰	8,7; 4,9			-	-
Asn ¹¹	3,9; 11,4	g^+, t	t	+	+
Met ¹²	4,2; 11,7	t	t	+	+
Lys ^{14, 4*}		g^+, g^-, t	g^+, g^-, t		
Lys ¹⁵	11,0; 3,2	g^+, t	g^+, t		+
Cys ¹⁶	5,8; 12,3	t	t	+	+
Arg ¹⁷	6,3; 9,0	t	t	+	+
Asp ^{18, 4*}		g^+, t	g^+, t		
Cys ¹⁹	11,5; 3,7	t	t	-	-
Cys ²⁰	2,0; 12,6	g^+, t	t	+	+
Asn ²³	8,1; 6,2	g^+, g^-, t	g^+, g^-, t		
Lys ^{25, 4*}		g^+, g^-	g^+, g^-		
Cys ²⁶	2,5; 12,5	g^+, t	g^+, t		
Phe ²⁷	3,9; 9,6	g^+	g^+	-	-
Gln ²⁸	10,7; 3,8	g^+	g^+	+	+
Cys ³¹	12,0; 4,9	t	t	-	-
Leu ³²	11,8; 3,4	g^+, t	g^+	+	+
Cys ³³	3,9; 12,7	g^+, t	g^-, t		
Asn ³⁴	7,2; 6,3	g^+, g^-, t	g^+, g^-, t		
Arg ³⁵	7,8; 4,8	g^+, g^-, t	g^+, g^-, t		

* На первом месте указана КССВ для β -протона с большим значением химического сдвига.

^{2*} g^+ , t и g^- — ротамеры относительно связи $C^{\alpha}-C^{\beta}$, отвечающие значениям χ^i —60, 180 и 60° соответственно. В первой колонке указаны ротамеры, полученные после расчета локальной структуры инсектотоксина по интенсивностям кросс-пиков ЯЭО, наблюдаемым между протонами i -го остатка и протоном NH $i+1$ -го остатка [19], а во второй — с помощью дистанционного алгоритма (программа DIANA).

^{3*} Указаны варианты стереохимического отнесения β -протонов, полученные по КССВ протонов $H-C^{\alpha}C^{\beta}-H$, (в ситуации, когда однозначно определен ротамер t или g^+ и по КССВ можно идентифицировать β -протоны, находящиеся в ориентации *gauche* и *trans* относительно протона $C^{\alpha}H$) и независимо с помощью глобального метода стереохимического отнесения, реализованного в программе GLOMSA (см. «Методику расчета»). Плюсом обозначен «прямой» вариант стереохимического отнесения, когда протон $H^{\beta 2}$ имеет больший химический сдвиг, чем $H^{\beta 3}$, а минусом — «обратный».

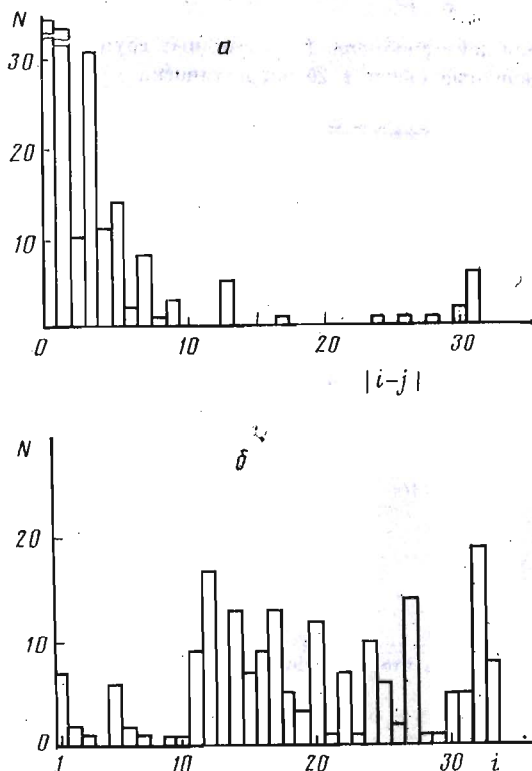
^{4*} Химические сдвиги β -протонов совпадают.

ограничениями на расстояния между атомами S^i и C^{β} остатков цистеина (i и j), образующих дисульфидную связь [21]. Ограничения на расстояние сверху и снизу соответствовали равновесной конфигурации дисульфида:

2,04 Å — для расстояния $S_i^{\gamma} \dots S_j^{\gamma}$, 3,05 Å — для $C_i^{\beta} \dots S_j^{\gamma}$ и 3,86 Å — для $C_i^{\beta} \dots C_j^{\beta}$.

На заключительном этапе расчета проводили энергетическое уточнение структуры молекулы инсектотоксина с помощью программы CHARMM [22] (рис. 2). Диэлектрическая проницаемость ϵ была выбрана равной 10. В целевую функцию включали два дополнительных члена, учитывающих ограничения на межатомные расстояния для 119 контактов ЯЭО с $\rho > 1$ и ограничения на торсионные углы ϕ основной цепи, обусловленные экспериментальными данными для КССВ протонов $H-NC^{\alpha}-H$, с весовыми факторами 40 А·моль/ккал и 10 град·моль/ккал соответственно. Для кросс-пиков ЯЭО, обусловленных взаимодействием нескольких пар протонов, эффективное расстояние r между контактирую-

Рис. 3. Зависимость числа экспериментальных контактов ЯЭО (N), инсектотоксина 15А от разности $\rho = |i-j|$ номеров i и j аминокислотных остатков, включающих в себя контактирующие атомы (а), и от номера остатка i для контактов ЯЭО, характеризующихся $\rho > 1$ (б). При расчете использовано 123 «внутриостаточных» контакта ЯЭО ($\rho = 0$) и 100 контактов ЯЭО между протонами соседних остатков ($\rho = 1$)



щими протонами или группами протонов вычисляли путем суммирования по модели « $1/r^6$ ». Ограничения на расстояния O...H и O...N для водородных связей при энергетическом уточнении не использовали.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение системы дисульфидных связей инсектотоксина 15А. После введения ограничений на водородные связи и учета стереохимических отнесений протонов (см. «Методику расчета») с помощью программы DIANA был получен набор из 20 конформаций инсектотоксина 15А с приемлемо низкими значениями штрафной функции ($0,7 \pm 0,2 \text{ \AA}^2$). При расчете этого набора, далее называемого базовым, не использовались ограничения на расстояния для дисульфидных связей. Низкие значения всех вкладов в штрафную функцию свидетельствуют о том, что полученные конформации инсектотоксина согласуются с экспериментальными данными ЯМР, а низкие среднеквадратичные расхождения (СКР) между конформациями ($0,9 \pm 0,3 \text{ \AA}$ по атомам основной цепи и $1,9 \pm 0,4 \text{ \AA}$ по всем неводородным атомам) указывают на значительное сходство рассчитанных конформаций (табл. 7).

В дальнейшем необходимо было установить систему дисульфидных связей инсектотоксина 15А, которая не была для него определена химическими методами. С этой целью анализировали расстояния между атомами серы остатков цистеина в полученном наборе конформаций молекулы (табл. 8). Равновесное расстояние S...S в дисульфиде составляет $2,04 \text{ \AA}$, но при расчете оно может оказаться несколько меньше, так как в программе DIANA уменьшены ван-дер-ваальсовы радиусы для атомов S в остатках цистеина. Атом S^7 остатка Cys²⁰ сближен на расстояние $1,2-6,6 \text{ \AA}$ только с S^1 Cys³³, тогда как расстояние от него до других атомов S^7 превышает 6 \AA во всех полученных конформациях молекулы (табл. 8). Следовательно, в инсектотоксине 15А реализуется дисульфидная связь Cys²⁰ - Cys³³. Аналогично остаток Cys² может образовать дисульфидную связь лишь с остатком Cys¹⁹, поскольку соответствующее расстояние $S^2 \dots S^{19}$ составляет $2,8-3,7 \text{ \AA}$, тогда как

Времена дейтерообмена ($t_{1/2}$) амидных групп NH, измеренные при pH 2,7 и 30° C [13], и водородные связи в 20 энергетически уточненных конформациях инсектотоксина I5A

Амидная группа	$t_{1/2}$, ч	Акцепторная группа	N *	Амидная группа	$t_{1/2}$, ч	Акцепторная группа	N *
Cys ² NH	<0,2	Cys ³¹ C=O	20	Cys ²⁰ NH	*	Cys ¹⁶ C=O	10
Met ³ NH	4,1	Cys ³¹ C=O	8			Arg ¹⁷ C=O	13
Cys ⁵ NH	46	Pro ²⁹ C=O	20 ^{2*}	Gly ²¹ NH	5,6	Asp ¹⁸ C=O	20
Thr ⁸ NH	0,6	Phe ⁶ C=O	20			Cys ¹⁹ C=O	10
Asp ⁹ NH	2,3	Phe ⁶ C=O	5	Gly ²² NH	5,8	Arg ¹⁷ C=O	18
Asn ¹¹ NH	<0,2	Asp ⁹ C ¹ O ₂ ⁻	20	Asn ²³ NH	0,3	Cys ²⁰ C=O	11
Asn ¹¹ N ^δ H ₂	<0,2	Asp ⁹ C ¹ O ₂ ⁻	20 ^{3*}	Gly ²⁴ NH	3,0	Arg ¹⁷ C=O	8
Met ¹² NH	42	Asp ⁹ C=O	20 ^{2*}	Lys ²⁵ NH	>100	Leu ³² C=O	20 ^{2*}
Lys ¹⁴ NH	7,9	Asn ¹¹ C=O	15	Cys ²⁶ NH	16,8	Не идентифицирована	
Lys ¹⁵ NH	>100	Asn ¹¹ C=O	20 ^{2*}			Gln ³⁰ C=O	20 ^{2*}
		Met ¹² C=O	6	Phe ²⁷ NH	>100	Phe ²⁷ C=O	13 ^{2*}
Cys ¹⁶ NH	>100	Met ¹² C=O	20 ^{2*}	Gln ³⁰ NH	>100	Met ³ C=O	20 ^{2*}
Arg ¹⁷ NH	>100	Ala ¹³ C=O	20 ^{2*}	Cys ³¹ NH	>100	Lys ²⁵ C=O	20 ^{2*}
Asp ¹⁸ NH	78	Lys ¹⁴ C=O	20 ^{2*}	Leu ³² NH	>100	Asn ²³ C=O	8
Cys ¹⁹ NH	>100	Lys ¹⁵ C=O	20 ^{2*}	Asn ³⁴ NH	2,4	Cys ³³ C=O	17
				Arg ³⁵ NH	0,3		

* N — число конформаций молекулы, в которых идентифицирована данная водородная связь (считалось, что она существует, если расстояние O...H не превышает 2,5 Å). Приведены только N ≥ 5.

** Водородные связи, введенные в программу DIANA как дополнительные ограничения на расстояния O...H и O...N при временах дейтерообмена протона NH свыше 40 ч.

** Считалось, что водородная связь N^δH₂...O₂C⁻ существует, если хотя бы один из протонов группы N^δH₂ приближен хотя бы с одним кислородом группы C¹O₂⁻ на расстояние меньше 2,5 Å.

* Времена дейтерообмена не измерялись.

Таблица 6

Стереохимическое отношение диастереоотропных групп инсектотоксина I5A

Амино-кислотный остаток	Химический сдвиг, δ (м. д.) протонов					
	H ^β 2	H ^β 3	H ^γ 2	H ^γ 3	H ^δ 2	H ^δ 3
Met ¹	2,19	2,38				
Cys ²	3,15	2,75				
Met ³			2,22	2,13		
Pro ⁴	2,14	1,21			3,63	3,82
Phe ⁶	2,92	3,23				
Pro ¹⁰	2,00	2,40	2,09	2,00	4,14	3,99
Asn ¹¹	3,06	2,63				
Met ¹²	2,57	2,24	2,99	2,33		
Cys ¹³	3,00	2,68				
Arg ¹⁷	1,97	1,85				
Cys ¹⁹	3,37	3,75				
Cys ²⁰	3,34	2,43				
Gly ²¹	3,95	4,14 *				
Gly ²²	3,49	4,57 *				
Gly ²⁴	4,73	3,87 *				
Phe ²⁷	2,97	3,04				
Gly ²⁸	3,52	4,26 *				
Gln ³⁰	2,22	1,91				
Leu ³²	1,97	1,38			0,89	0,65 **

* Для остатков глицина приведены химические сдвиги групп C^αH₂.

** Для остатка Leu³² приведены химические сдвиги групп C^δH₃.

Усредненные значения среднеквадратичного расхождения координат атомов (СКР) * и нарушений ограничений для 20 конформаций молекулы инсектотоксина I5A, рассчитанных с помощью программы DIANA, без введения ограничений на дисульфидные связи (базовый набор) и после введения ограничений для трех возможных систем дисульфидных связей: I (5-26, 16-31), II (5-16, 26-31) и III (5-31, 16-26) (дисульфидные связи 2-19 и 20-33 во всех наборах совпадают)

Параметры	Набор конформаций			
	базовый	I	II	III
СКР для атомов основной цепи N, C α и C	0,9 \pm 0,3	0,7 \pm 0,2	0,7 \pm 0,2	0,6 \pm 0,2
СКР для всех неводородных атомов	1,9 \pm 0,4	1,7 \pm 0,3	1,7 \pm 0,3	1,6 \pm 0,2
Нарушения ограничений на расстояния сверху **	1,2(0,3)	3,0(0,3)	6,7(0,3)	5,0(0,4)
Нарушения ограничений на расстояния снизу **	0,0(0,1)	0,6(0,2)	1,5(0,3)	2,0(0,3)
Нарушения ван-дер-ваальсовых радиусов **	0,5(0,2)	1,0(0,2)	1,5(0,2)	1,2(0,2)
Нарушения ограничений на торсионные углы **	0,1(3,5)	0,1(3,9)	0,4(4,4)	1,0(8,1)

* Среднюю величину и стандартное отклонение СКР рассчитывали при попарном сравнении конформаций.

** Приведены среднее число нарушений, превышающих 0,2 Å (5° для торсионных углов), и (в скобках) средняя величина максимального в данной конформации отклонения (в Å для расстояний и в град для углов).

Таблица 8

Минимальное (верхняя строка) и максимальное (нижняя строка) значения расстояний (Å) между атомами S боковых цепей остатков цистеина в базовом наборе из 20 конформаций молекулы инсектотоксина I5A

Cys	Номер остатка цистеина						
	5	16	19	20	26	31	33
2	6,2 12,2	6,5 8,9	2,8 3,7	6,3 8,9	9,2 12,6	5,1 8,3	4,0 8,1
5		2,7 6,8	6,7 11,9	10,9 14,2	1,2 7,9	2,4 6,6	5,4 13,8
16			5,9 6,9	7,6 9,1	2,1 6,2	1,2 2,9	3,1 9,0
19				7,2 7,8	7,9 12,4	4,3 7,2	3,7 7,9
20					9,0 12,8	7,7 9,2	1,2 6,6
26						2,0 6,6	6,4 13,0
31							3,1 8,9

расстояние от S¹ Cys² до остальных атомов серы во всех конформациях превышает 5 Å (табл. 8). Остальные четыре остатка цистеина (5, 16, 26, 31) инсектотоксина тесно сближены в пространстве и могут образовать дисульфидные связи в любой комбинации (табл. 8). Поэтому в дальнейших расчетах рассматривали все три возможных для этих остатков варианта образования двух дисульфидных связей: Cys⁵ - Cys²⁶, Cys¹⁶ - Cys³¹ (далее обозначаемый как вариант I), Cys⁵ - Cys¹⁶, Cys²⁶ - Cys³¹ (вариант II) и Cys⁵ - Cys³¹, Cys¹⁶ - Cys²⁶ (вариант III).

Для каждого из трех вариантов расчет пространственной структуры инсектотоксина I5A был проведен заново с дополнительными ограничениями на расстояния между атомами C ^{β} и S¹ боковых цепей остатков цистеина (см. «Методику расчета»), и получено три набора из 20 кон-

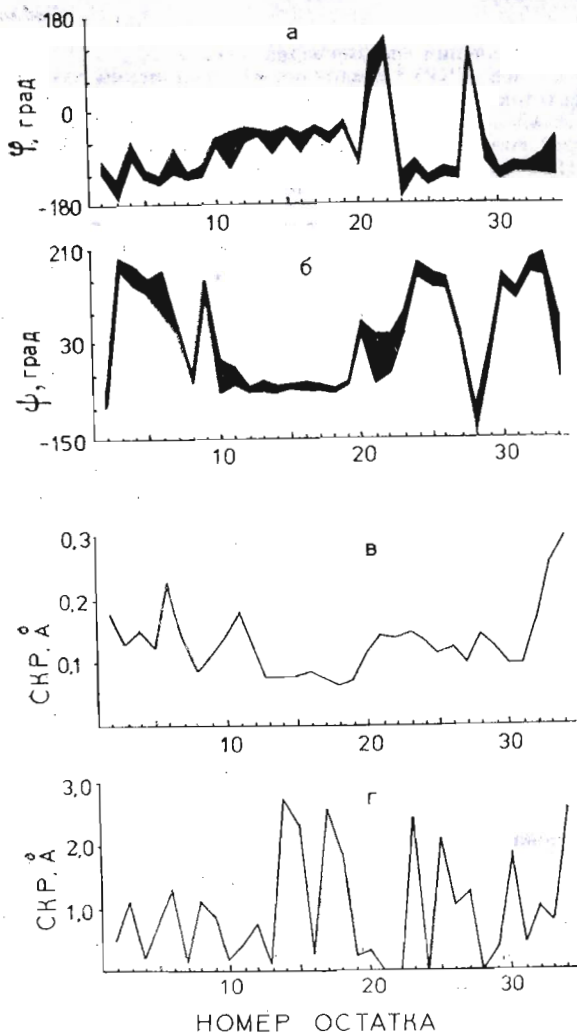


Рис. 4. Локальная вариабельность основной и боковых цепей молекулы инсектотоксина I5A для 20 энергетически уточненных конформаций с системой дисульфидных связей I: диапазоны значений торсионных углов основной цепи ψ (а) и ψ (б); средние локальные среднеквадратичные расхождения координат (СКР) атомов основной цепи (в); средние локальные СКР неводородных атомов боковых цепей (г). В случае «в» СКР рассчитывали для атомов основной цепи N, C α и C фрагментов молекулы, включающих в себя три остатка, и относили к центральному остатку фрагмента. В случае «г» конформации совмещали по атомам основной цепи, а СКР вычисляли по неводородным атомам боковой цепи центрального остатка. При вычислении СКР усреднение проводили по всем парам рассчитанных конформаций молекулы. Конформации совмещали по методу Мак-Лэчлана [23]

формаций в каждом. Средние СКР при попарном сравнении конформаций молекулы внутри каждого набора несколько уменьшились после введения ограничений на S—S-связи и составили около 0,7 Å для атомов основной цепи и 1,7 Å для всех неводородных атомов молекулы (табл. 7). Все три набора удовлетворительно согласуются с экспериментальными данными, однако при вариантах II и III во всех полученных конформациях незначительно нарушаются ограничения на расстояния S γ —S γ , C β —C β и C β —S γ в дисульфидных связях, что отражается на общем числе нарушений для ограничений сверху и снизу (см. табл. 7).

На завершающем этапе расчета проводилась минимизация энергии полученных конформаций с учетом экспериментальных ограничений с помощью программы CHARMM (см. «Методику расчета»). В процессе минимизации энергии структура инсектотоксина изменялась незначительно: среднее СКР между конформацией молекулы до и после энергетического уточнения для наборов I, II и III составило соответственно 0,8±0,1, 0,9±0,2 и 0,9±0,2 Å. Все полученные конформации характеризуются низкими значениями энергии и незначительными остаточными нарушениями экспериментальных ограничений (табл. 9), однако система дисульфидных связей I более предпочтительна энергетически. Пространственная структура инсектотоксина I5A при всех трех вариантах замыкания дисульфидных связей практически идентична: СКР по атомам основной цепи между средними конформациями наборов I, II и III составляют

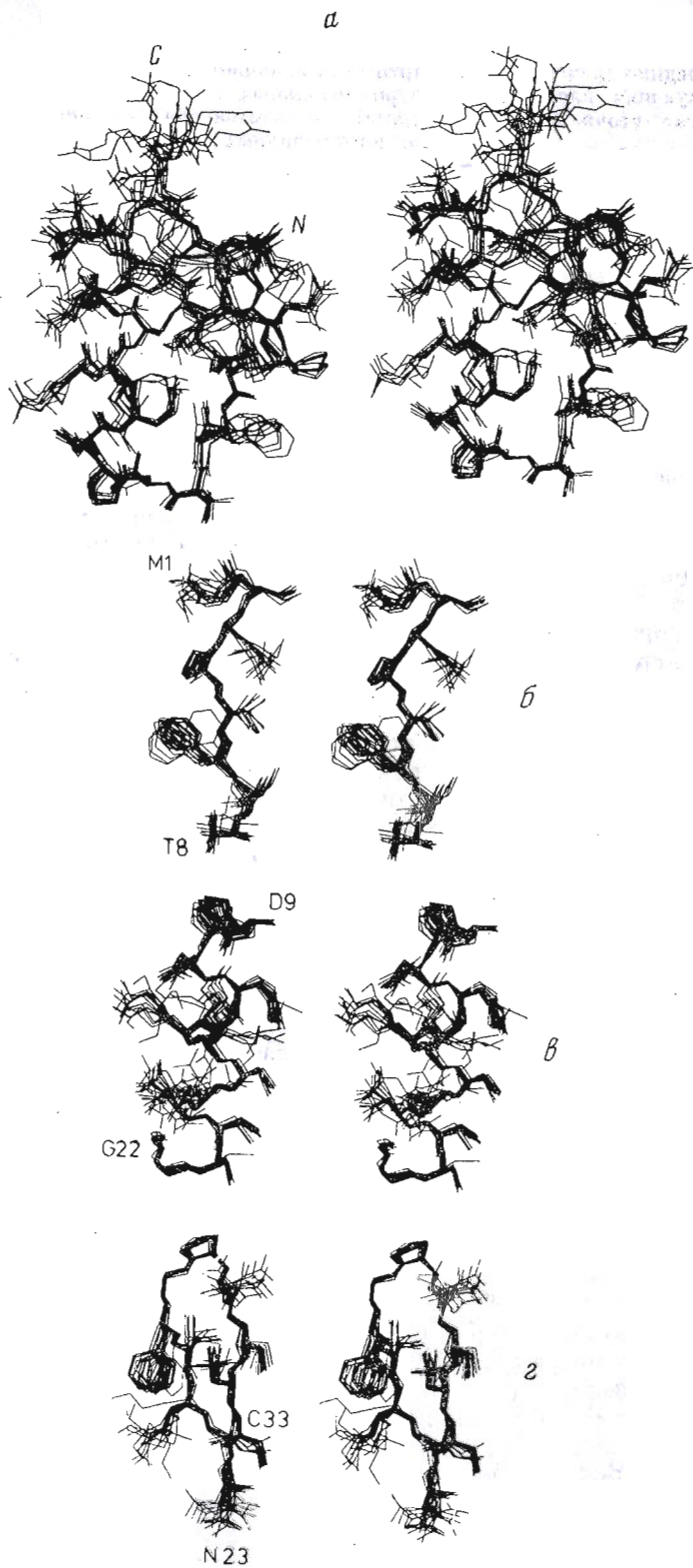


Рис. 5. Стереизображение энергетически уточненных конформаций инсектотоксина 15А с системой дисульфидных связей I, совмещенных по атомам основной цепи N, C^α и C': а - вся молекула; б - фрагмент Cys²-Thr⁸; е - фрагмент Asp⁹-Gly²²; з - фрагмент Asn²³-Cys³³. На рисунке а совмещены 10, а на рисунках б-г - 20 лучших конформаций

Средние значения и стандартные отклонения энергии и параметров, характеризующих нарушения экспериментальных ограничений, для набора из 20 энергетически уточненных конформаций инсектотоксина I5A при трех вариантах образования дисульфидных связей

Параметр	Система дисульфидных связей		
	I	II	III
Общая энергия, ккал/моль	-157,6±9,3	-141,4±7,9	-148,4±7,1
Вклад ограничений на контакты ЯЭО, ккал/моль	3,0±1,1	4,3±1,2	3,4±1,1
Вклад ограничений на торсионные углы, ккал/моль	4,9±0,8	4,3±1,0	5,3±0,9
Число нарушений свыше 0,2 Å	1,3±0,7	1,6±0,8	1,3±0,6
Максимальное нарушение, Å	0,3±0,1	0,3±0,1	0,3±0,1
Сумма нарушений, Å	3,2±0,4	5,3±1,1	3,9±1,0

0,46 (I и II), 0,43 (I и III) и 0,47 Å (II и III) (координаты атомов средней конформации рассчитываются как среднее арифметическое координат конформаций, входящих в набор). Это приблизительно отвечает средним СКР конформаций внутри каждого из наборов.

Таким образом, все три варианта образования дисульфидных связей удовлетворяют экспериментальным данным ЯМР и близки как геометрически, так и по величине конформационной энергии. Однако наиболее вероятен вариант I (5–26, 16–31), поскольку он реализуется для чарбдотоксина и токсина ν -3, являющихся гомологами инсектотоксина I5A (рис. 1). Именно для такой системы дисульфидных связей (2–19, 20–33, 5–26 и 16–31) и проводили весь дальнейший анализ полученного набора конформаций молекулы.

Пространственное строение инсектотоксина I5A. Судя по полученной системе водородных связей (табл. 5) и торсионным углам (рис. 4а, б), трехмерная структура инсектотоксина I5A (рис. 5) включает в себя α -спираль (Pro¹⁰–Cys²⁰) и состоящую из трех тяжей (Cys²–Cys⁵, Gly²⁴–Gly²⁸ и Pro²⁹–Cys³³) антипараллельную β -структуру. Это согласуется в основном с результатами расчета структуры инсектотоксина с помощью дистанционного геометрического алгоритма в псевдоатомном приближении (α -спираль Met¹²–Cys¹⁹ и β -шпилька Asn²³–Asn³⁴ [13–15]).

Все энергетически уточненные конформации инсектотоксина с системой I-дисульфидных связей демонстрируют значительное сходство, за исключением N-концевого (Met¹) и C-концевых (Asn³⁴ и Arg³⁵) остатков, конформации которых определились с меньшей точностью из-за меньшего числа идентифицированных контактов ЯЭО (рис. 5). Средние СКР для атомов основной цепи на участках Met¹–Arg³⁵ и Cys²–Cys³³ при сравнении со средней конформацией набора составляют 0,6±0,1 и 0,5±0,1 Å соответственно (табл. 10). В то же время величины СКР заметно меньше (~0,3 Å) для отдельно взятых фрагментов молекулы Met²–Thr⁸ (β -тяж и петля), Asp⁹–Gly²² (α -спираль и шарнирный участок из двух остатков глицина) и Asn⁹–Cys³³ (β -шпилька) (табл. 10). Различия между средними СКР для всей молекулы и отдельных фрагментов свидетельствуют о некотором изменении взаимного расположения указанных фрагментов молекулы в разных конформациях.

На рис. 4 представлены характеристики variability структуры для отдельных аминокислотных остатков инсектотоксина I5A. Структура основной цепи точнее всего определилась на α -спиральном участке Ala¹³–Cys¹⁹ (средние локальные СКР здесь составляют всего 0,06–0,08 Å, см. рис. 4е), с несколько меньшей точностью – для β -структуры, а наиболее переменными участками основной цепи Phe⁶–Thr⁷ (петля), Asn¹¹–Met¹² (начало α -спирали), Gly²¹–Gly²² (шарнирный участок между α -спиралью и β -структурой) и Cys³³–Arg³⁵ (C-конец), где наблюдаются наибольшие диапазоны торсионных углов ϕ и ψ и локальные СКР (рис. 4а–е). Для боковых цепей локальные СКР на порядок выше, чем для основной

Среднеквадратичные расхождения (СКР) координат атомов (Å) для 20 энергетически уточненных конформаций инсектотоксина I5A с системой дисульфидных связей I*

Фрагмент молекулы	Выборка атомов	
	N, C ^α , C'	все неводородные атомы
1-35	0,64±0,11	1,35±0,20
2-33	0,54±0,12	1,23±0,11
2-8	0,30±0,12	1,70±0,15
9-22	0,30±0,10	0,91±0,16
23-33	0,35±0,10	0,93±0,11

* При вычислении СКР по методу Мак-Лэчлана [23] каждая из 20 конформаций сравнивалась с усредненной конформацией инсектотоксина, которую получили вычислением средней величины каждой координаты каждого атома в наборе конформаций, предварительно совмещенных с первой конформацией набора.

(рис. 4г). При этом наиболее вариабельны ориентированные в растворе гидрофильные и заряженные боковые цепи остатков Lys¹⁴, Lys¹⁵, Arg¹⁷, Asp¹⁸ (α -спираль), Asn²³, Lys²⁵, Gln³⁰ (β -структура) и Asn³⁴.

При энергетическом уточнении структуры инсектотоксина сохраняются все 12 водородных связей молекулы, использованных как дополнительные ограничения для программы DIANA (табл. 5). Время дейтерообмена протонов NH, участвующих в этих водородных связях, превышает 40 ч [13]. Дополнительно образовалось еще 14 водородных связей. Для 9 из них также увеличено время дейтерообмена протонов NH (табл. 5), а наличие двух других (Asp⁹ C¹O₂⁻...HN Asn¹¹ и Asp⁹ C¹O₂⁻...H₂N⁶ Asn¹¹) согласуется с pH-зависимостями химических сдвигов протонов NH и N⁶H₂ Asn¹¹ [13].

Анализ полученной системы водородных связей (табл. 5) и диапазонов торсионных углов ϕ и ψ (рис. 4а, б) позволяет точнее описать регулярные элементы вторичной структуры инсектотоксина. В частности, участок 2-5 действительно образует третий тяж β -структуры, поскольку между ним и участком 29-31 формируются водородные связи, а величина угла ψ входящих в него остатков составляет около 150°. α -Спираль инсектотоксина на N-конце (Pro¹⁰ - Met¹²) переходит в виток спирали 3₁₀. Действительно, здесь наблюдается аномальная для α -спирали КССВ протонов H-NC^α-H остатка Asn¹¹ (8,6 Гц [13]) и формируется характерная для спирали 3₁₀ водородная связь Met¹² NH...O=C Asp⁹, а протон NH Ala¹³ вообще не образует водородных связей, что согласуется с малым временем его дейтерообмена. В остальном α -спираль инсектотоксина типична для глобулярных белков. Она начинается с остатка пролина, часто встречающегося в первой позиции спиралей, а завершается характерным для окончания α -спиралей структурным «шаблоном» [24], в котором остаток Gly²¹ находится в конформации левой спирали, что позволяет образоваться дополнительным водородным связям Gly²¹ NH...O=C Asp¹⁸ и Gly²² NH...O=C Arg¹⁷ (см. табл. 5), продолжающим α -спираль в обратном направлении. Одна сторона (поверхность) α -спирали, контактирующая с β -структурой, сформирована гидрофобными остатками Pro¹⁰, Met¹², Ala¹³, Cys¹³, Cys¹⁹, Cys²⁴, а другая, обращенная в растворитель, — гидрофильными и заряженными остатками Asp⁹, Asn¹¹, Lys¹⁴, Lys¹⁵, Arg¹⁷ и Asp¹⁸.

Структура и функции токсинов скорпиона

Инсектотоксин I5A и другие «короткие» и «длинные» токсины скорпиона имеют сходное пространственное строение (см. рис. 6). Прежде всего они содержат общий структурный «шаблон» из α -спирали и β -тяжа, соединенных двумя дисульфидными связями между остатками цистеина, образующими в α -спирали и β -тяже соответственно последовательности

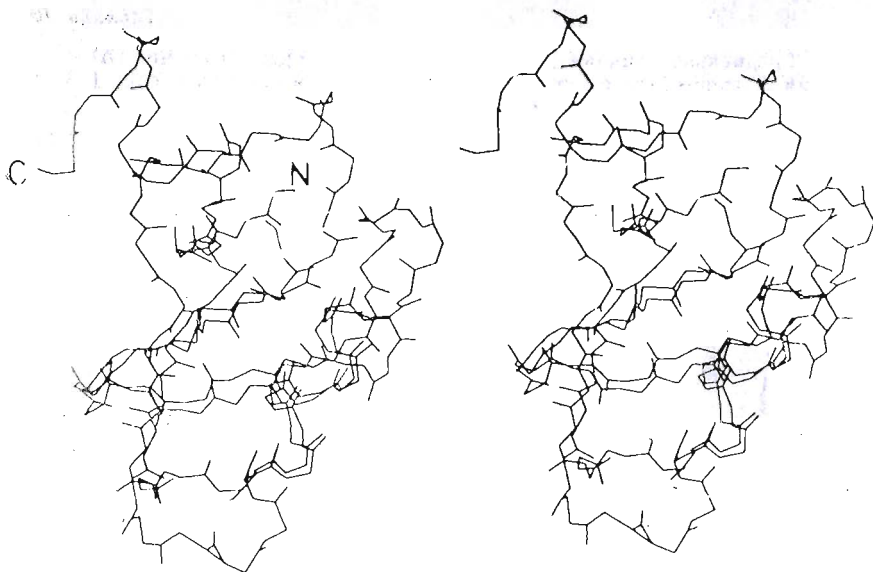


Рис. 6. Стереизображение атомов основной цепи кристаллографической структуры токсина v-3 *C. sculpturatus* [9] и одной из конформаций инсектотоксина I5A *B. euryus*, рассчитанной по данным ЯМР. Структуры совмещали по координатам C α -атомов на участках 3–7, 13–21 и 23–34 инсектотоксина I5A и 14–18, 22–30 и 38–49 токсина v-3. СКР координат C α -атомов на этих участках составило 1,2 Å

Cys-X-X-X-Cys и Cys-X-Cys (буквой «X» обозначен произвольный аминокислотный остаток, см. рис. 7). Такой же «шаблон» имеется и в исследованных с помощью спектроскопии ^1H -ЯМР токсинах пчелиного яда апа-мине и MCD-пептиде [25–28], а также в вазоактивных пептидах эндотеллинах и сарафотоксинах [29, 30] с той лишь разницей, что из-за малого размера всех этих пептидов (около 20 аминокислотных остатков) у них отсутствует второй тяж β -структуры и вытянутый участок пептидной цепи Cys-X-Cys расположен в аминокислотной последовательности перед α -спиралью. В эндотеллинах и сарафотоксинах, кроме того, дисульфидные связи между α -спиралью и вытянутым участком образуются в другой комбинации. По-видимому, этот структурный «шаблон» можно использовать для конструирования новых пептидов. Помимо двух указанных S–S-связей токсины скорпиона содержат и третью эволюционно консервативную дисульфидную связь (Cys 5 –Cys 26 , см. рис. 1), соединяющую два соседних тяжа β -структуры.

Для детального сравнения пространственного строения токсинов скорпиона можно использовать кристаллографическую структуру «длинного» токсина v-3 скорпиона *C. sculpturatus* [9] (рис. 6) и отнесение регулярных элементов вторичной структуры, сделанное по данным спектроскопии ^1H -ЯМР для чарибдотоксина и лейуротоксина [5, 6, 8] (рис. 7). N-Концевые участки всех токсинов скорпиона (кроме, возможно, лейуротоксина) образуют первый тяж β -структуры. У «длинного» токсина v-3 этот тяж сформирован двумя отрезками пептидной цепи (2–5 и 14–16), разделенными петлей из 10 аминокислотных остатков (см. рис. 6–8 и табл. 11). Именно отсутствие этой петли и присоединенной к ней дополнительной дисульфидной связью протяженной C-концевой петли (рис. 6) и отличает «короткие» токсины скорпиона от «длинных». Затем, вплоть до α -спирали, следует вариабельный участок, образующий у инсектотоксина I5A виток спирали 3_{10} (рис. 6), а у токсина v-3 – петлю, в которой пептидная цепь ориентирована как дополнительный тяж β -структуры (рис. 6) и остаток Gly 20 даже образует две характерные водородные связи (рис. 8a). Для чарибдотоксина и ноксиустоксина этот участок состоит всего из трех, а для лейуротоксина – из двух остатков (рис. 1). Однако по крайней мере для чарибдотоксина трех остатков достаточно, чтобы соединить N-концевой участок β -структуры и α -спираль без изменения пространственной структуры, поскольку расстояние между C α -атомами последнего остатка β -тяжа

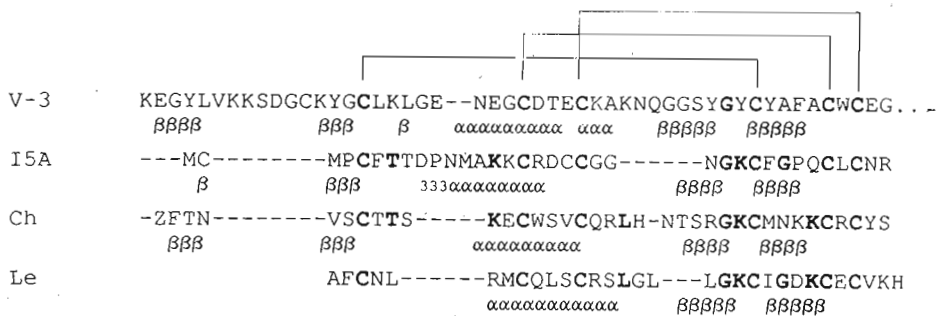


Рис. 7. Сравнение вторичных структур токсинов скорпиона v-3 *C. sculpturatus*, I5A *B. eupreus*, чарибдотоксина и лейуротоксина *Leiurus quinquestriatis hebraeus*, идентифицированных по данным рентгеноструктурного анализа [9] и спектроскопии ¹H-ЯМР [5, 6, 8, 13]. Указаны дисульфидные связи, определенные химическими методами для чарибдотоксина и «длинных» токсинов скорпиона (к которым относится токсин v-3) [4, 6]. Символами β, α и β указаны соответственно участки спирали 3₁₀, α-спирали и β-структуры. Регулярные элементы вторичной структуры токсина v-3 идентифицированы по торсионным углам φ, φ и водородным связям на участках Tyr¹⁴-Cys¹⁶, Gly²⁰ и Lys³²-Glu³⁴, отличаются от приведенных в работе [9]. N-Концевой участок β-структуры чарибдотоксина идентифицирован по приведенным в работе [5] контактам ЯЭО с C-концевым участком пептидной цепи, увеличенным временем дейтериеобмена протонов NH, KCCB протонов H-NC^α-H и интенсивным кросс-пикам ЯЭО N_i^α/NH_{i+1}. Жирным шрифтом выделены совпадающие остатки

и первого гомологичного остатка в α-спирали (Cys¹⁶ и Glu²³ для токсина v-3) составляет около 10 Å.

α-Спираль у инсектотоксина I5A на 1–2 остатка короче, чем у остальных токсинов (рис. 7). Второй варибельный участок пептидной цепи (рис. 7) соединяет α-спираль и β-шпильку, которая для токсина v-3 и лейуротоксина на два остатка длиннее. Взаимная ориентация α-спирали и β-структуры, по-видимому, одинакова для всех токсинов. В частности, при совмещении пространственных структур инсектотоксина I5A и токсина v-3 СКР по координатам атомов основной цепи на соответствующих участках α-спирали и β-шпильки (13–20 и 24–33 инсектотоксина и 22–29 и 39–48 токсина v-3) составляет 1,1 Å. Следует, однако, отметить, что у токсина v-3 (как и у ряда «коротких» токсинов, см. рис. 1) отсутствует дисульфидная связь инсектотоксина 2–19, соединяющая N-концевой β-тяж с α-спиралью, а расстояние между C^β-атомами остатков, замещающих цистеин у токсина v-3 (Leu⁵ и Glu²⁸, см. табл. 11), увеличено с 4 до 6,5 Å.

Токсины скорпиона, как и змеиные нейротоксины, образуют белковую глобулу, имеющую форму сильно сплющенного эллипсоида. У «длинных» токсинов одна сторона глобулы сформирована гидрофобными боковыми цепями остатков β-структуры и взаимодействует с клеточными рецепторами [1]. Противоположная сторона глобулы, образованная α-спиралью, остается доступной антителам, когда «длинные» токсины связываются с натриевыми каналами нервных клеток [31]. У инсектотоксина I5A и двух его близких гомологов (рис. 1) эта гидрофобная область поверхности сохраняется. Она сформирована неполярными боковыми цепями консервативных в данной подгруппе остатков (Met¹, Cys², Met³, Pro⁴, Cys⁵, Phe⁶, Phe²⁷, Pro²⁹ и Leu³²) и содержит единственную гидрофильную пептидную группу боковой цепи Glu³⁰, тогда как противоположная сторона глобулы сформирована в основном заряженными остатками α-спирали (рис. 9). Возможно, и для данной подгруппы «коротких» токсинов эта гидрофобная поверхность имеет функциональное значение.

У чарибдотоксина и лейуротоксина почти все перечисленные гидрофобные остатки заменены на гидрофильные (рис. 1). Это, по-видимому, связано с изменившейся специфичностью этих токсинов, которые подобно апамину блокируют Ca²⁺-зависимые кальциевые каналы. Известно, что для биологической активности апамина необходимы два соседних остатка аргинина в α-спирали, образующих аминокислотную последовательность Cys-Ala-Arg-Arg-Cys в упомянутом выше структурном «шаблоне» из α-спирали и вытянутого участка пептидной цепи, соединенных двумя

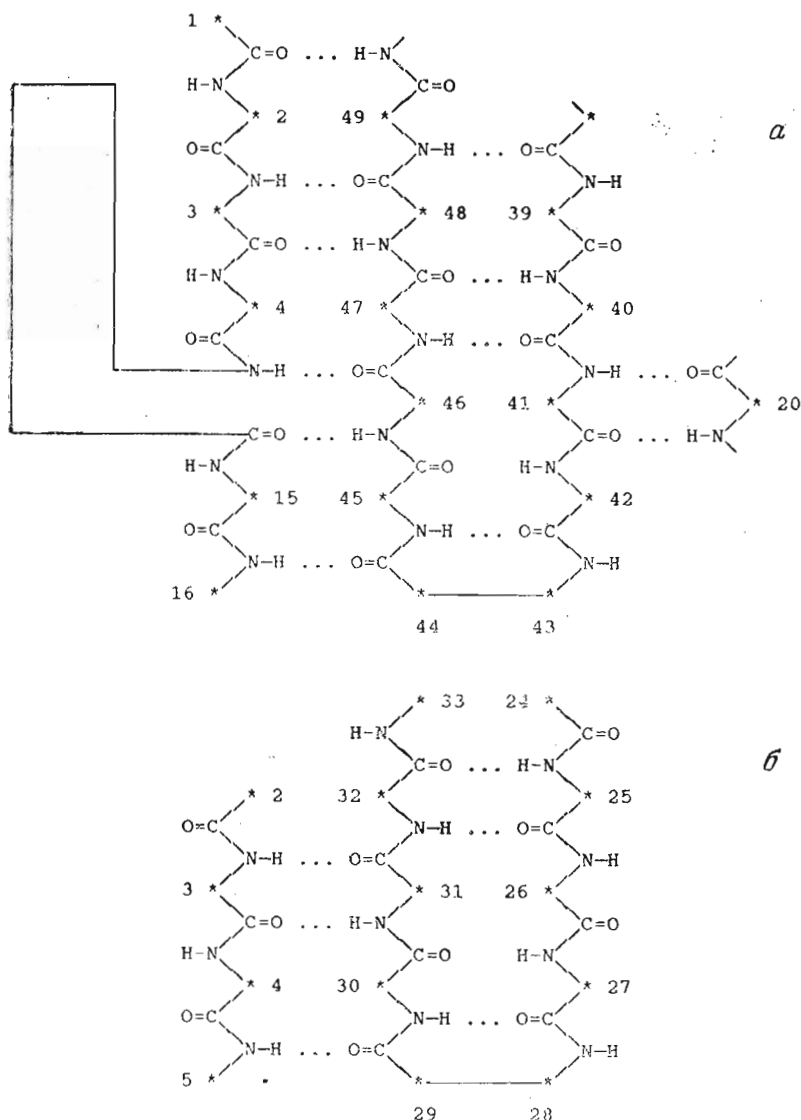


Рис. 8. Сравнение систем водородных связей в β -структурах токсина v-3 (а) и инсектотоксина I5A (б). Звездочками указаны C^{α} -атомы. Цифры соответствуют номерам остатков в аминокислотных последовательностях соответствующих токсинов. Сплошной линией схематически изображена петля 5–14 токсина v-3, присутствие которой отличает «длинные» токсины от «коротких»

дисульфидными связями. У лейуротоксина тоже есть два остатка аргинина, расположенные с одной стороны α -спирали, но отделенные двумя ее витками друг от друга (Arg^6 и Arg^{13}), а в случае чарибдотоксина последний остаток аргинина в α -спирали (Arg^{19}) сближен с остатками Arg^{25} (как видно на рис. 7, им соответствуют соседние остатки Gly^{22} и Asn^{23} инсектотоксина I5A). По-видимому, чарибдотоксин и лейуротоксин связываются с ионными каналами не β -структурным, а α -спиральным участком и поэтому гидрофобные остатки поверхности заменены на гидрофильные, что позволяет стабилизировать белковую глобулу за счет более благоприятных взаимодействий с растворителем.

Теоретический конформационный анализ инсектотоксина I1 и ренатурация токсинов скорпиона

Полученную нами пространственную структуру инсектотоксина I5A интересно сравнить со структурой его близкого гомолога — инсектотоксина I1 (рис. 1), рассчитанной при помощи теоретического конформацион-

**Совпадающие фрагменты пространственных структур инсектотоксина
I5A и токсина v-3**

Приведены расстояния между сближенными C^α-атомами кристаллографической структуры токсина v-3 и одной из энергетически уточненных структур инсектотоксина I5A после совмещения этих структур в пространстве. Подчеркнуты совпадающие остатки цистеина

Остаток в		Расстояние C ^α ...C ^α , Å	Остаток в		Расстояние C ^α ...C ^α , Å
I5A	v-3		I5A	v-3	
Met ¹	Tyr ⁴	2,1	Asn ²³	Tyr ³⁸	1,5
Cys ²	Leu ⁵	1,9	Gly ²⁴	Gly ³⁹	0,4
Met ³	Tyr ¹⁴	1,9	Lys ²⁵	Tyr ⁴⁰	2,4
Pro ⁴	Gly ¹⁵	1,5	Cys ²⁶	Cys ⁴¹	1,4
Cys ⁵	Cys ¹⁶	1,5	Phe ²⁷	Tyr ⁴²	0,5
Phe ⁶	Leu ¹⁷	1,0	Gly ²⁸	Ala ⁴³	2,0
Thr ⁷	Lys ¹⁸	1,6	Pro ²⁹	Phe ⁴⁴	1,0
Ala ¹³	Asn ²²	1,2	Gln ³⁰	Ala ⁴⁵	0,7
Lys ¹⁴	Glu ²³	0,6	Cys ³¹	Cys ⁴⁶	0,8
Lys ¹⁵	Gly ²⁴	0,8	Leu ³²	Trp ⁴⁷	1,2
Cys ¹⁶	Cys ²⁵	0,8	Cys ³³	Cys ⁴⁸	0,8
Arg ¹⁷	Asp ²⁶	0,5	Asn ³⁴	Glu ⁴⁹	0,6
Asp ¹⁸	Thr ²⁷	0,4			
Cys ¹⁹	Glu ²⁸	1,0			
Cys ²⁰	Cys ²⁹	0,4			
Gly ²¹	Lys ³⁰	0,9			

ного анализа [32]. Пространственные структуры токсинов I1 и I5A должны быть практически идентичны, поскольку их аминокислотные последовательности гомологичны на 73%, делеции и вставки отсутствуют, а замены затрагивают лишь остатки, экспонированные в растворитель. Однако рассчитанная теоретически конформация токсина I1 близка к полученной нами экспериментально структуре токсина I5A лишь на участках 10–15 (фрагмент α-спирали) и 25–31 (один из тяжёлых β-структуры с β-изгибом Gly²⁸–Pro²⁹). Антипараллельная β-структура отсутствует в теоретически предсказанной конформации инсектотоксина I1. Следует, однако, отметить, что дисульфидная связь Cys²⁰–Cys³³ была получена правильно, а остатки Cys²⁶ и Cys³¹, образующие в теоретической конформации дисульфидную связь, действительно сближены в пространстве.

Результаты теоретического конформационного анализа инсектотоксина I1, по-видимому, обусловлены принципиальными ограничениями метода, возникающими при рассмотрении больших пептидов. Как и во многих аналогичных работах (см., например, обзоры [33–35]), расчет проводился путем отбора низкоэнергетических конформаций изолированных фрагментов инсектотоксина, длина которых постепенно возрастала, достигая размеров целой молекулы. Основное предположение при этом заключается в том, что конформации, невыгодные энергетически на коротких изолированных фрагментах пептидной цепи, можно исключить из дальнейшего рассмотрения. Это предположение справедливо, если в нативной структуре реализуется α-спираль или β-изгиб, компактно упакованные уже на коротких участках, но может не выполняться для вытянутых тяжёлых β-структуры, которые не обладают компактной упаковкой сами по себе, но стабилизируются взаимодействиями с удаленными в полипептидной цепи участками молекулы. И в самом деле, если для α-спирального участка 10–16 и β-изгиба 28–31 при расчете были получены результаты, близкие к реальности, то комбинация вытянутого β-тяжеля 2–6 и петли 7–10 инсектотоксина, невыгодная энергетически на изолированном участке пептидной цепи, была отброшена при теоретическом конформационном анализе фрагмента 1–10 инсектотоксина I1 [32].

Следует отметить, однако, что теоретический конформационный анализ постепенно возрастающих фрагментов молекулы в известной степени мо-

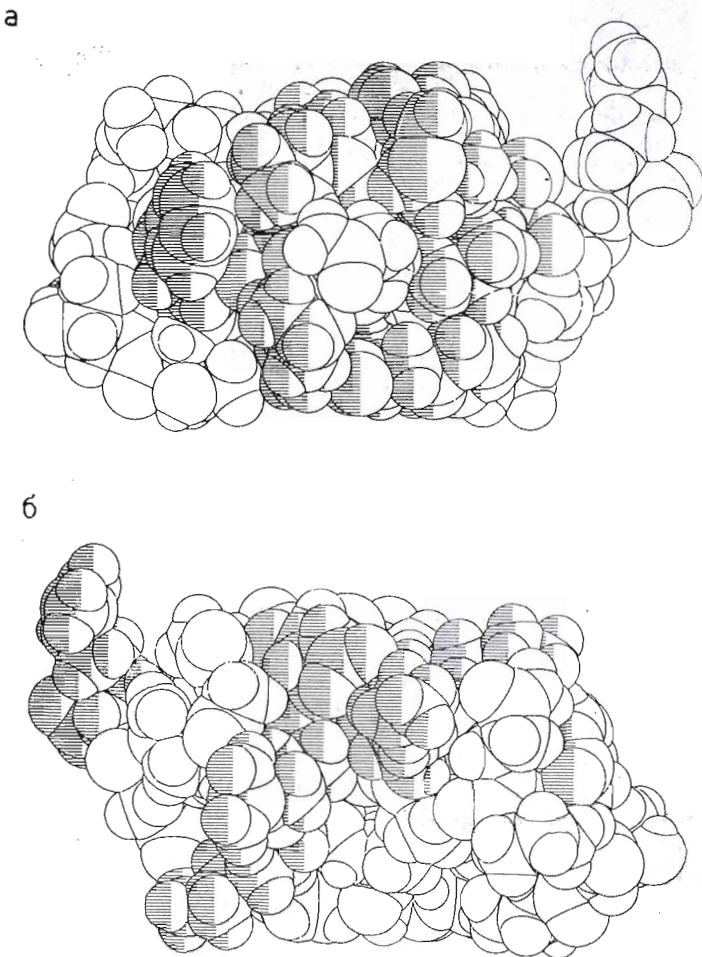


Рис. 9. Изображение поверхности молекулы инсектотоксина I5A: *a* – затенены неполярные аминокислотные остатки (Ala, Leu, Met, Gly, Pro, Phe, Cys); *б* – вид молекулы, развернутой на 180° вокруг вертикальной оси; затенены заряженные остатки (Lys Arg, Glu, Asp)

делирует реальный процесс ренатурации пептида в растворе, поскольку на коротких фрагментах молекулы, как и в развернутой полипептидной цепи, реализуются лишь взаимодействия между сближенными в аминокислотной последовательности остатками. Поэтому корректность предсказания α -спирали и β -изгиба инсектотоксина I1 на участках 10–16 и 28–31 можно объяснить тем, что эти α -спираль и β -изгиб инициируют ренатурацию пептидной цепи токсина в растворе. При этом на начальном этапе укладки пептидной цепи β -шпилька 26–31 может дополнительно стабилизироваться дисульфидной связью между сближенными в пространстве остатками Cys²⁶ и Cys³¹, как это и сделано в теоретически рассчитанной конформации.

В дальнейшем взаимная компоновка α -спирали и β -структуры может сопровождаться перестройкой системы дисульфидных связей токсинов скорпиона, как у панкреатического ингибитора трипсина (ВРТИ) [36]. Интересно, что α -спираль и β -структура ВРТИ существенно стабилизируются, когда между ними, как и у токсинов скорпиона, формируется дисульфидная связь [37]. На заключительном этапе укладки пептидной цепи у «коротких» токсинов, по-видимому, реализуются конформации с тремя различными системами дисульфидных связей (I–III, см. табл. 7 и 9), поскольку энергетически и геометрически они очень близки и их трудно отличить друг от друга даже по данным ЯМР. Это предположение подтверждается экспериментами по ренатурации синтетического аналога.

чарибдотоксина [6]. При образовании его дисульфидных связей путем необратимого окисления SH-групп кислородом воздуха образуются три различные конформации молекулы, которые разделяются хроматографически. Однако затем при добавлении тиол-дисульфидного реагента все они переходят в одну структуру, имеющую нативную систему дисульфидных связей.

Авторы выражают благодарность проф. К. Вютриху (ETH, Цюрих, Швейцария) за любезно предоставленные программы DIANA и GLOMSA.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fontecilla-Camps J. C., Almasy R. J., Ealick S. E., Suddath F. L., Watt D. D., Feldmann R. J., Bugg C. E. // Trends Biochem. Sci. 1981. V. 6. № 11. P. 291-296.
2. Гришин Е. В., Волкова Т. М., Солдатова Л. Н. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 2. С. 155-164.
3. Rochat H., Bernard P., Couraud F. // Adv. Cytopharmacol. N. Y.: Raven Press, 1979. V. 3. P. 325-334.
4. Gimenez-Gallego G., Navia M. A., Reuben J. P., Katz G. M., Kaczorowski G. J., Garcia M. L. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 10. P. 3329-3333.
5. Bontems F., Roumestand C., Boyot P., Gilquin B., Doljansky Y., Menez A., Toma F. // Eur. J. Biochem. 1991. V. 196. № 1. P. 19-28.
6. Lambert P., Kuroda H., Chino N., Watanabe T. X., Kimura T., Sakakibara S. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1990. V. 170. № 2. P. 684-690.
7. Carbone E., Prestipino G., Spadavecchia L., Franciolini F., Possani L. D. // Pflugers Arch. 1987. B. 408. № 2. S. 423-431.
8. Martins J. C., Zhang W., Tartar A., Lazdunski M., Borremans F. A. M. // FEBS Lett. 1990. V. 260. № 2. P. 249-253.
9. Almasy R. J., Fontecilla-Camps J. C., Suddath F. L., Bugg C. E. // J. Mol. Biol. 1983. V. 170. № 2. P. 497-527.
10. Fontecilla-Camps J. C., Habersetzer-Rochat C., Rochat H. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 20. P. 7443-7447.
11. Пашков В. С., Хоанг Н. А., Майоров В. Н., Быстров В. Ф. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 10. С. 1306-1315.
12. 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.
13. Арсеньев А. С., Кондаков В. И., Майоров В. Н., Быстров В. Ф., Овчинников Ю. А. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 12. С. 1667-1689.
14. Arseniev A. S., Kondakov V. I., Maiorov V. N., Bystrov V. F. // FEBS Lett. 1984. V. 165. № 1. P. 57-62.
15. Maiorov V. N., Arseniev A. S. // J. Molec. Struct. 1984. V. 114. № 2. P. 339-402.
16. Майоров В. Н., Арсеньев А. С., Быстров В. Ф. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 9. С. 1192-1209.
17. Braun W. // Quart. Rev. Biophys. 1987. V. 19. № 3/4. P. 115-157.
18. Clore G. M., Gronenborn A. M. // Protein Eng. 1987. V. 1. № 4. P. 275-288.
19. Ломизе А. Л., Арсеньев А. С., Масленников И. В., Быстров В. Ф. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 10. С. 1310-1324.
20. Guntert K., Braun W., Wuthrich K. // J. Mol. Biol. 1991. V. 217. № 3. P. 517-530.
21. Momany F. A., McGuire R. F., Burgess A. W., Scheraga H. A. // J. Phys. Chem. 1975. V. 79. № 22. P. 2361-2381.
22. Brooks B. R., Brucoleri R. E., Olafson B. D., States D. J., Swaminathan S., Karplus M. // J. Comput. Chem. 1983. V. 4. № 2. P. 187-217.
23. McLachlan A. D. // J. Mol. Biol. 1979. V. 128. № 1. P. 49-79.
24. Richardson J. S., Richardson D. C. // Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation/Ed. Fasman G. D. Plenum Press. 1989. P. 14-17.
25. Bystrov V. F., Okhanov V. V., Miroshnikov A. I., Ovchinnikov Yu. A. // FEBS Lett. 1980. V. 119. № 1. P. 113-117.
26. Wemmer D. E., Kallenbach N. R. // Biochemistry. 1983. V. 22. № 8. P. 1901-1906.
27. Kumar D. E., Wemmer D. E., Kallenbach N. R. // Biophys. Chem. 1988. V. 31. № 1. P. 113-119.
28. Pease J. H. B., Wemmer D. E. // Biochemistry. 1988. V. 27. № 22. P. 8491-8498.
29. Bđolach A., Wolberg Z., Fleminger G., Kochva E. // FEBS Lett. 1989. V. 256. № 1. P. 1-3.
30. Sauder V., Hoflack J., Pelton J. T. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1991. V. 37. № 3. P. 174-179.
31. Bachraoui E., Ayeб M. E., Granier G., Rochat H. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 167. № 2. P. 371-375.
32. Попов Е. М., Швырков В. И., Спасов В. З. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 1. С. 61-71.
33. Попов Е. М. Структурная организация белков. М.: Наука, 1989. С. 113-318.
34. Scheraga H. A. // Biopolymers. 1983. V. 22. № 1. P. 1-14.
35. Pincus M. R., Scheraga H. A. // Acc. Chem. Res. 1985. V. 18. № 12. P. 372-379.

36. Creighton T. E. // J. Phys. Chem. 1985. V. 89. № 22. P. 2452-2459.
37. Baldwin R. L. // Trends Biochem. Sci. 1989. V. 14. P. 291-294.

Поступила в редакцию
4.VII.1991

A. L. LOMIZE, V. N. MAIOROV, A. S. ARSENIYEV

**SPATIAL STRUCTURE OF INSECTOTOXIN I5A *BUTHUS EUPEUS*
BY ¹H NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY**

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

The solution structure of insectotoxin I5A (35 residues) from scorpion *Buthus eupeus* was determined on the basis of 386 interproton distance restraints 12 hydrogen-bonding restraints and 113 dihedral angle restraints derived from ¹H NMR experiments. A group of 20 structures was calculated with the distance geometry program DIANA followed by the restrained energy minimization with the program CHARMM. The atomic RMS distribution about the mean coordinate position is 0,64±0,11 Å for the backbone atoms and 1,35±0,20 Å for all atoms. The structure contains an α-helix (residues 10-20) and a three - stranded antiparallel β-sheet (residues 2-5, 24-28 and 29-33). A pairing of the eight cysteine residues of insectotoxin I5A was established basing on NMR data. Three disulfide bridges (residues 2-19, 16-31 and 20-33) connect the α-helix with the β-sheet, and the fourth one (5-26) joins β-strands together. The spatial fold of secondary structure elements (the α-helix and the β-sheet) of the insectotoxin I5A is very similar to those of the other short and long scorpion toxins in spite of a low (about 20%) sequence homology.