



УДК 598.126-114.52:577.322.52:543.422.25

## СТРУКТУРА И КОНФОРМАЦИОННАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ СЛАБОГО ТОКСИНА ИЗ ЯДА КОБРЫ *Naja kaouthia*

© 2001 г. А. В. Елецкий, И. В. Масленников, В. В. Кухтина,  
Ю. Н. Уткин, В. И. Цетлин, А. С. Арсеньев<sup>#</sup>

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 10.07.2000 г. Принята к печати 18.09.2000 г.

В двумерных спектрах <sup>1</sup>H-ЯМР слабого токсина (WTX) из яда кобры *Naja kaouthia* проведено отнесение сигналов для всех 65 а.о. Последовательным отнесением спиновых систем установлена аминокислотная последовательность WTX, оказавшаяся сходной с первичной структурой токсина CM-9a из яда кобры *N. kaouthia*. В отличие от CM-9a, WTX содержит дополнительный остаток Trp36, остатки Lys50 и Tyr52 переставлены местами, а вместо остатка Arg2 присутствует Thr. Для ряда остатков WTX показано наличие в спектрах двух компонент приблизительно равной интенсивности, что обусловлено конформационной гетерогенностью полипептида вследствие *цис-транс*-изомеризации пептидной связи Arg32–Pro33. Полученные данные (контакты ядерного эффекта Оверхаузера, константы спин-спинового взаимодействия протонов и скорости обмена амидных протонов на дейтерий растворителя) позволили определить вторичную структуру двух форм WTX, характеризующуюся наличием двух антипараллельных β-слоев, первый из которых состоит из двух тяжей (участки 1–5 и 13–17), а второй – из трех (участки 23–28, 38–43 и 55–59).

**Ключевые слова:** ЯМР; токсины слабые; белки, структура вторичная, конформационная гетерогенность.

### ВВЕДЕНИЕ

Яд змей семейства Elapidae содержит большое число гомологичных токсинов. Среди них выделяются короткие (60–62 а.о., 4 внутримолекулярные дисульфидные связи) и длинные (66–75 а.о., 5 внутримолекулярных дисульфидных связей) α-нейротоксины (α-NT) [1], действующие на никотиновый ацетилхолиновый рецептор (nAChR), кардиотоксины или цитотоксины (CT), способные образовывать поры в мембранах *in vitro* [2], и другие менее изученные токсины (см. обзор [3]). В числе малоизученных токсинов есть так называемые слабые токсины (WT), полипептидная цепь которых длиной 62–65 а.о. стабилизирована пятью дисульфидными связями [4–8]. Своё название они получили из-за низкой токсичности: LD<sub>50</sub> слабых токсинов варьирует от 5 до 82 мг/кг, тогда как для α-NT LD<sub>50</sub> составляет около 0.1 мг/кг [9, 10]. Кроме того, слабые токсины отличаются от α-NT присутствием одной из пяти дисульфидных связей

в N-концевой части молекулы. До сих пор достоверно не известна мишень действия WT.

В последнее время появились данные о белках, не являющихся компонентами змеиного яда, но имеющих пространственную структуру, схожую со структурой α-NT и CT, в виде трех петель, соединённых дисульфидными связями. В первую очередь это мембраносвязанные белки семейства Lu-6, экспонированные на поверхности различных клеток млекопитающих, такие, как CD59 [11, 12]. Другим примером является недавно обнаруженный в нервных клетках мышей белок lpx1, способный модулировать работу nAChR [13]. Общей со слабыми токсинами особенностью структуры этих белков является присутствие одной из пяти дисульфидных связей в N-концевой области молекулы.

По аминокислотной последовательности WT наиболее близки к коротким α-NT. Гомология между ними составляет около 35%. Помимо структурно важных консервативных остатков Cys, Pro и Gly, WT содержат остатки Lys26 и Lys50, соответствующие функционально важным консервативным остаткам лизина в α-NT (рис. 1). В то же время между WT и α-NT есть существенные различия в аминокислотной последовательности, особенно в N-концевой области. Очевидно, что и конфор-

Сокращения: 2D – двумерный; ЯЭО – ядерный эффект Оверхаузера; DQF-COSY – корреляционная спектроскопия с использованием двухквантового фильтра; TOCSY – тотальная корреляционная спектроскопия; NOESY – спектроскопия ЯЭО; WTX – слабый токсин *Naja kaouthia*; WT – слабые токсины; NT – нейротоксины; CT – цитотоксины.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 330-59-29; e-mail: aars@nmr.ru).

## Слабые токсины (WT)

|    |        |        |                   |                   |                   |             |                    |                   |              |
|----|--------|--------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------|--------------------|-------------------|--------------|
| 1  | WTX,   |        | <b>LTCLNCPEMF</b> | <b>CGKFQICRNG</b> | <b>EKICFKKLHQ</b> | RRPLSWRYIR  | <b>GCADTCPV GK</b> | <b>PYEMIECCST</b> | <b>DKCNR</b> |
| 2  | CM-9a, | P25679 | <b>LRCLNCPEMF</b> | <b>CGKFQICRNG</b> | <b>EKICFKKLHQ</b> | RRPLS-RYIR  | <b>GCADTCPVGY</b>  | <b>EKEMIECCST</b> | <b>DKCNR</b> |
| 3  | CM-10, | P25680 | <b>LRCLNCPEVF</b> | <b>CRNFHTCRNG</b> | <b>EKICFKRFDQ</b> | RKLLGKRYTR  | <b>GCAVTCFVAK</b>  | <b>PREIVECCST</b> | <b>DGCNR</b> |
| 4  | CM-11, | P01401 | <b>LTCLICPEKY</b> | <b>CNKVHTCRNG</b> | <b>ENQCFKRFNE</b> | RKLLGKRYTR  | <b>GCAATCPEAK</b>  | <b>PREIVECCST</b> | <b>DRCNK</b> |
| 5  | S4C11, | P01400 | <b>LTCLICPEKY</b> | <b>CNKVHTCRNG</b> | <b>ENICFKRFYE</b> | GNLLGKRYPR  | <b>GCAATCPEAK</b>  | <b>PREIVECCST</b> | <b>DKCNH</b> |
| 6  | TXW5,  | P29179 | <b>LTCLICPEKY</b> | <b>CNKVHTCLNG</b> | <b>ENICFKRF-N</b> | R-ILGKRYDL  | <b>GCAATCPTVK</b>  | <b>TG-IVQCCST</b> | <b>DKCNH</b> |
| 7  | TXW6,  | P29180 | <b>LTCLICPEKY</b> | <b>CNKVHTCLNG</b> | <b>EKICFKRYSE</b> | RKLLGKRYIR  | <b>GCADTCPVRK</b>  | <b>PREIVQCCST</b> | <b>DKCNH</b> |
| 8  | TXW7,  | P29181 | <b>LTCLNCPEVY</b> | <b>CRRFQICRDG</b> | <b>EKICFKKFDQ</b> | RNLLGKRYRR  | <b>GCAATCPEAK</b>  | <b>PREIVQCCST</b> | <b>DKCNR</b> |
| 9  | TXW8,  | P29182 | <b>LTCLNCPEVY</b> | <b>CRRFQICRDG</b> | <b>EKICFKKFDQ</b> | RNLLGKRYEI  | <b>GCAATCPEAK</b>  | <b>PREIVQCCST</b> | <b>DKCNR</b> |
| 10 | CM-13B | P01399 | <b>LTFCNCPVY</b>  | <b>CNRFHTCRNG</b> | <b>EKICFKRFNE</b> | RKLLGKRYTR  | <b>GCAATCFVAK</b>  | <b>PREIVECCST</b> | <b>DRCNH</b> |
| 11 |        | O42255 | <b>LTCLNCPEMF</b> | <b>CGKFQICRNG</b> | <b>EKICFKKLQ</b>  | RRPFSRLRYIR | <b>GCAATCPGTK</b>  | <b>PRDMVECCST</b> | <b>DRCNR</b> |
| 12 |        | O42256 | <b>LTCLNCPEMF</b> | <b>CGKFQICRDG</b> | <b>EKICFKKLQ</b>  | RRPFSRLRYIR | <b>GCAATCPGTK</b>  | <b>PRDMVECCST</b> | <b>DRCNR</b> |
| 13 |        | Q9W713 | <b>LTCLNCPEMF</b> | <b>CGKFQICRNG</b> | <b>EKICFKMLQ</b>  | RRPFSRLRYIR | <b>GCAATCPGTK</b>  | <b>PRDMVECCST</b> | <b>DRCNR</b> |
| 14 |        | Q9W714 | <b>LTCLNCPEMF</b> | <b>CGKFQICRNG</b> | <b>EKICFKMLQ</b>  | RRPFSRLRYIR | <b>GCAATCPGTK</b>  | <b>PRDMVECCST</b> | <b>DRCNR</b> |

## Короткие α-нейротоксины (α-NT)

|    |            |        |                  |                   |                    |            |                   |                   |              |
|----|------------|--------|------------------|-------------------|--------------------|------------|-------------------|-------------------|--------------|
| 15 | Токсин II, | P01425 | <b>LECHNQSSQ</b> | <b>PPTTKSCP-G</b> | <b>DTNICYNKRWR</b> | DHR-GTIIER | <b>GC--GCPTVK</b> | <b>PGINLKCCTT</b> | <b>DRCNN</b> |
| 16 | α-NT II    | P01427 | <b>LECHNQSSQ</b> | <b>PPTTKTCS-G</b> | <b>ETNICYKQWWS</b> | DHR-GTIIER | <b>GC--GCPVK</b>  | <b>PGVNLNCCRT</b> | <b>DRCNN</b> |

## Цитотоксины (СТ)

|    |      |        |                   |                   |                   |            |                   |                   |              |
|----|------|--------|-------------------|-------------------|-------------------|------------|-------------------|-------------------|--------------|
| 17 | СТγ, | P01468 | <b>LKC-NQLIPP</b> | <b>F--WKTCPKG</b> | <b>KNLCYKMTMR</b> | AAP-MVPVKR | <b>GCIDVCPKSS</b> | <b>LLIKYMCNT</b>  | <b>DKCN-</b> |
| 18 | СТII | P01441 | <b>LKC-KKLVEL</b> | <b>F--SKTCPAG</b> | <b>KNLCYKMFV</b>  | AAP-HVPVKR | <b>GCIDVCPKSS</b> | <b>LLVKYVCCNT</b> | <b>DKCN-</b> |

**Рис. 1.** Аминокислотные последовательности змеиных токсинов трех классов: слабых токсинов (1–14), коротких α-нейротоксинов (15, 16) и цитотоксинов (17, 18). Жирным шрифтом выделены аминокислотные остатки, консервативные у всех трех классов; консервативные остатки двух классов, α-нейротоксинов и слабых токсинов, подчеркнуты. 1 – WTX *N. kaouthia*, аминокислотная последовательность установлена в настоящей работе; 2 – CM-9a *N. kaouthia* [4]; 3 – CM-10 *N. nivea* [4]; 4 – CM-11 *N. haje* [5]; 5 – S4C11 *N. melanoleuca* [6]; 6–9 – слабые токсины *N. naja* [7]; 10 – CM-13B *N. haje* [8]; 11–14 – транслированные последовательности генов предшественников слабых токсинов *N. sputarix*; 15 – токсин II *Hemachatus haemachatus* [9]; 16 – α-NT II *N. oxiana* [10]; 17 – СТγ *N. nigricollis* [14]; 18 – СТ II *N. oxiana* [15].

мации N-концевой области у данных токсинов различаются из-за наличия дополнительной дисульфидной связи в WT и различного положения остатков пролина. Внутри самого класса WT гомология по аминокислотной последовательности составляет более 66% (рис. 1), что может свидетельствовать о специфической функции WT.

Для понимания функциональной роли класса слабых токсинов, а также для выяснения эволюционных и функциональных связей между токсинами змей и белками суперсемейства Lu-6 необходимо знание пространственной структуры слабых токсинов. Настоящая работа посвящена исследованию методом <sup>1</sup>H-ЯМР пространственной структуры слабого токсина WTX из яда тайской кобры *Naja kaouthia*.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

WTX выделяли из яда кобры *N. kaouthia* аналогично методике работы [16]. N-Концевое секвенирование первых десяти аминокислотных остатков показало, что остатки 1 и 3–10 соответствуют опубликованной аминокислотной последовательности токсина CM-9a, выделенного ранее из этого же яда [4] и обладающего уникальной среди

всех выделенных токсинов змей последовательностью на участке 1–10. Однако экспериментально определенная молекулярная масса токсина WTX (7615 Да) отличается от теоретической, рассчитанной согласно литературным данным для токсина CM-9a (7493 Да, [4]). Очевидно, токсин WTX является новым, ранее не известным полипептидным компонентом яда кобры *N. kaouthia*, высокогомологичным токсину CM-9a.

Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР токсина WTX содержат больше кросс-пиков, чем можно было ожидать, исходя из аминокислотной последовательности CM-9a. В частности, в NH-C<sup>α</sup>H-области спектра DQF-COSY токсина WTX (см. ниже рис. 4) вместо ожидаемых 60 присутствуют 73 кросс-пика. Результаты масс-спектрометрии MALDI свидетельствовали о химической индивидуальности и мономерности белка в растворе. Поэтому наиболее вероятная причина присутствия в спектре DQF-COSY большего числа кросс-пиков – конформационная гетерогенность WTX в водном растворе.

Таким образом, отнесение сигналов в спектрах <sup>1</sup>H-ЯМР WTX осложнялось двумя обстоятельствами: во-первых, отсутствием информации об аминокислотной последовательности белка, за исклю-

чением девяти идентифицированных *N*-концевых остатков; во-вторых, наличием конформационной гетерогенности (в этом случае одному протону может соответствовать два и более сигналов). Учитывая эти обстоятельства, мы приступили к выделению протонных спиновых систем аминокислотных остатков в спектрах DQF-COSY и TOCSY в H<sub>2</sub>O. Были выделены следующие типы спиновых систем: 13 уникальных (4 Gly, 1 Ala, 1 Val, 3 Thr и 4 Pro), 19 систем Lys/Arg, 31 система AMX-типа (Cys, Asp, Asn, Phe, His, Ser, Trp и Tyr) и 11 систем, характерных для остатков GLX-типа (Glu, Gln и Met). В спектре TOCSY и DQF-COSY в D<sub>2</sub>O были выделены семь спиновых систем остатков Leu и пять – Ile. Еще две спиновые системы остатков Pro были не полностью отнесены в спектре TOCSY в D<sub>2</sub>O.

Далее, в спектрах DQF-COSY и TOCSY в D<sub>2</sub>O были идентифицированы спиновые системы протонов боковых цепей ароматических аминокислотных остатков (4 Phe, 3 Tyr, 2 His и 2 Trp), а в спектрах NOESY и TOCSY в H<sub>2</sub>O были найдены четыре пары кросс-пиков, характерных для CONH<sub>2</sub>-групп боковых цепей остатков Asn и Gln. При помощи спектров NOESY эти CONH<sub>2</sub>-группы были связаны с C<sup>α</sup>H-протонами остатков GLX-типа или с C<sup>β</sup>H-протонами остатков AMX-типа. В результате две спиновые системы были определены, как соответствующие остаткам Asn, и две – как соответствующие остаткам Gln. Еще одна спиновая система остатка Asn, позже отнесенная к остатку Asn64, была определена только по кросс-пикам между C<sup>β</sup>H- и N<sup>δ</sup>H-протонами боковой цепи, поскольку N<sup>δ</sup>H-протоны имели настолько близкие химические сдвиги (таблица), что кросс-пик между ними был не отличим от диагонали.

Далее мы приступили к последовательному отнесению спиновых систем. При этом мы опирались на результаты идентификации остатков 1 и 3–10. Кроме того, мы предполагали, что консервативные во всех известных слабых токсинах змей остатки Gly20, Cys24, Phe25, Lys26, Gly41, Cys42, Cys46, Pro47 и Thr60, Asp61, Lys62, Cys63, Asn64 (рис. 1) присутствуют и в аминокислотной последовательности WTX. При этом мы учитывали, что одному остатку может соответствовать более одной спиновой системы. Последовательное отнесение проводилось по традиционной схеме [17] на основании интенсивных кросс-пиков ЯЭО между NH-протоном (C<sup>δ</sup>H-протонами в случае Pro) *i*-ой спиновой системы и NH-, C<sup>α</sup>H- и C<sup>β</sup>H-протонами (*i* – 1)-ой спиновой системы. Для последовательного отнесения использовался спектр NOESY с временем смешивания 200 мс, снятый при 40°C.

В качестве стартовых точек для последовательного отнесения использовались уникальные спиновые системы остатков Gly, Ala, Val и Thr и спиновая система остатка Leu1, которую отличает отсутствие кросс-пиков с участием NH-протона. Затем последовательное отнесение было продолжено, начиная уже со спиновых систем остатков Phe, Tyr, His, Trp, Asn и Gln. Результаты последовательного отнесения к определенным аминокислотным остаткам в последовательности представлены в таблице и на рис. 2.

При последовательном отнесении обнаружались следующие расхождения между нашими данными и опубликованной аминокислотной последовательностью CM-9a [4]. Во-первых, все три спиновые системы остатков Thr были однозначно отнесены к трем разным остаткам, причем одна из них соответствовала остатку Thr2 вместо Arg2 в CM-9a. Во-вторых, две спиновые системы остатка Trp соответствовали остатку номер 36 между остатками Ser35 и Arg37, тогда как по литературным данным токсин CM-9a вообще не содержит остатков Trp [4]. Наконец картина последовательных ЯЭО-контактов для участка 49–53 (рис. 3) отвечала не известной последовательности CM-9a (Gly49Tyr50Pro51Lys52Glu53 [4]), а последовательности Gly49Lys50Pro51Tyr52Glu53.

Установленная на основании данных ЯМР аминокислотная последовательность WTX приведена на рис. 1. Она соответствует молекулярной массе токсина, полученной с помощью масс-спектрометрии MALDI, и подтверждается полным секвенированием по методу Эдмана и методом масс-спектрометрии [18].

В процессе последовательного отнесения были определены конфигурации пептидных связей Xxx-Pro. Наличие кросс-пиков между, по крайней мере, одним из C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub>-протонов и C<sup>α</sup>H-протоном предыдущего остатка свидетельствует о *транс*-конфигурации пептидных связей Cys46/Pro47 и Lys50/Pro51, где каждому остатку соответствует только одна спиновая система. В то же время остаткам Cys6 и Pro7 соответствуют по две спиновые системы, которые в спектрах, снятых при 40°C, отнесены не полностью. В спектрах, снятых при 50°C, спиновые системы Pro7 полностью различимы, а ЯЭО-контакты между двумя парами спиновых систем Cys6/Pro7 свидетельствуют о *транс*-конфигурации связи Cys6-Pro7. Остаткам Arg32 и Pro33 также соответствуют по две спиновые системы. В одной паре спиновых систем наблюдается сильный контакт между C<sup>α</sup>H Arg32 и C<sup>δ</sup>H Pro33, тогда как в другой присутствует контакт между C<sup>α</sup>H Arg32 и C<sup>α</sup>H Pro33. Следовательно, пептидная связь Arg32-Pro33 в токсине CM-9a подвержена *цис-транс*-изомеризации.

Химические сдвиги сигналов протонов и КССВ протонов Н-NC<sup>α</sup>-Н транс- и цис-форм слабого токсина WTX из яда кобры *N. kaouthia* в Н<sub>2</sub>О (рН 2.9, 40°С)

| Остаток | Химический сдвиг, м.д.* |                  |                  |  | <sup>3</sup> J <sub>NHα</sub> , Гц |
|---------|-------------------------|------------------|------------------|--|------------------------------------|
|         | NH                      | C <sup>α</sup> H | C <sup>β</sup> H | другие протоны   |                                    |
| Leu1    |                         | 4.25             | 1.53             | C <sup>γ</sup> H 1.53; C <sup>δ</sup> H <sub>3</sub> 0.78  |                                    |
|         |                         | 4.25             | 1.53             | C <sup>γ</sup> H 1.53; C <sup>δ</sup> H <sub>3</sub> 0.78  |                                    |
| Thr2    | 8.17                    | 5.20             | 3.71             | C <sup>γ</sup> H <sub>3</sub> 1.01   | 10.0                               |
|         | 8.17                    | 5.20             | 3.71             | C <sup>γ</sup> H <sub>3</sub> 1.01   | 10.0                               |
| Cys3    | 8.63                    | 5.12             | 2.63, 2.89       |  | 10.2                               |
|         | 8.63                    | 5.12             | 2.63, 2.89       |  | 10.2                               |
| Leu4    | 9.16                    | 4.78             | 1.51             | C <sup>γ</sup> H 1.55; C <sup>δ</sup> H <sub>3</sub> 0.84, 0.89  | 8.4                                |
|         | 9.19                    | 4.80             | 1.53             | C <sup>γ</sup> H 1.54; C <sup>δ</sup> H <sub>3</sub> 0.84, 0.89  | 8.4                                |
| Asn5    | 8.57                    | 4.76             | 2.31, 3.01       | N <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> 6.42, 7.29   | 9.2                                |
|         | 8.59                    | 4.78             | 2.31, 3.01       | N <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> 6.42, 7.29   | 9.2                                |
| Cys6    | 7.13                    | 5.13             | 3.47, 3.73       |  | 8.7                                |
|         | 7.16                    | 5.21             | 3.51, 3.82       |  | 8.4                                |
| Pro7    |                         | 4.92             | 1.92, 2.05       | C <sup>γ</sup> H <sub>2</sub> -, C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> -   |                                    |
|         |                         | 5.04             | 2.13, 2.30       | C <sup>γ</sup> H <sub>2</sub> -, C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> 3.90, -   |                                    |
| Glu8    | 7.52                    | 4.73             | 1.93, 2.36       | C <sup>γ</sup> H <sub>2</sub> 2.44, 2.93   | 6.0                                |
|         | 7.61                    | 4.60             | 1.97, 2.36       | C <sup>γ</sup> H <sub>2</sub> 2.49, 2.91   | -                                  |
| Met9    | 8.97                    | 3.82             | 1.95             | C <sup>γ</sup> H <sub>2</sub> 2.06, 2.14; C <sup>ε</sup> H <sub>3</sub> 1.96   | <5                                 |
|         | 9.06                    | 3.92             | 1.97             | C <sup>γ</sup> H <sub>2</sub> 2.07, 2.13; C <sup>ε</sup> H <sub>3</sub> 2.04   | 6.2                                |
| Phe10   | 7.92                    | 4.91             | 2.88, 3.12       | H2, H6 7.29; H3, H5 7.37; H4 7.43  | 9.7                                |
|         | 7.94                    | 4.93             | 2.89, 3.14       | H2, H6 7.29; H3, H5 7.37; H4 7.43  | 9.6                                |
| Cys11   | 8.09                    | 4.82             | 3.37, 3.97       |  | 5.9                                |
|         | 8.09                    | 4.82             | 3.37, 3.97       |  | 5.9                                |
| Gly12   | 8.69                    | 3.66, 4.59       |                  |  |                                    |
|         | 8.69                    | 3.66, 4.59       |                  |  |                                    |
| Lys13   | 6.96                    | 4.34             | 1.59, 1.84       | C <sup>γ</sup> H <sub>2</sub> 1.48; C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> 1.71; C <sup>ε</sup> H <sub>2</sub> 3.05; N <sup>ε</sup> H <sub>3</sub> <sup>+</sup> - | 8.2                                |
|         | 6.99                    | 4.35             | 1.61, 1.85       | C <sup>γ</sup> H <sub>2</sub> 1.49; C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> 1.69; C <sup>ε</sup> H <sub>2</sub> 3.05; N <sup>ε</sup> H <sub>3</sub> <sup>+</sup> - | 8.2                                |
| Phe14   | 7.80                    | 5.32             | 2.64, 2.80       | H2, H6 7.05; H3, H5 7.39; H5 7.40  | 10.3                               |
|         | 7.80                    | 5.32             | 2.64, 2.80       | H2, H6 7.05; H3, H5 7.39; H5 7.40  | 10.3                               |
| Gln15   | 9.03                    | 4.77             | 1.97, 2.05       | C <sup>γ</sup> H <sub>2</sub> 2.14, 2.30; N <sup>ε</sup> H <sub>2</sub> 6.99, 7.30   | 7.5                                |
|         | 9.03                    | 4.77             | 1.97, 2.05       | C <sup>γ</sup> H <sub>2</sub> 2.14, 2.30; N <sup>ε</sup> H <sub>2</sub> 6.99, 7.30   | 7.5                                |
| Ile16   | 8.75                    | 4.38             | 1.82             | C <sup>γ</sup> H <sub>2</sub> 1.27, 1.72; C <sup>γ</sup> H <sub>3</sub> 1.00; C <sup>δ</sup> H <sub>3</sub> 0.97   | 9.1                                |
|         | 8.75                    | 4.38             | 1.82             | C <sup>γ</sup> H <sub>2</sub> 1.27, 1.72; C <sup>γ</sup> H <sub>3</sub> 1.00; C <sup>δ</sup> H <sub>3</sub> 0.97   | 9.1                                |
| Cys17   | 8.93                    | 4.81             | 2.81, 3.65       |  | 7.3                                |
|         | 8.93                    | 4.81             | 2.81, 3.65       |  | 7.3                                |
| Arg18   | 8.38                    | 4.49             | 1.70, 1.97       | C <sup>γ</sup> H <sub>2</sub> 1.76; C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> 3.27; N <sup>ε</sup> H 7.18  | 7.0                                |
|         | 8.38                    | 4.49             | 1.70, 1.97       | C <sup>γ</sup> H <sub>2</sub> 1.76; C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> 3.27; N <sup>ε</sup> H 7.18  | 7.0                                |
| Asn19   | 8.77                    | 4.48             | 2.83             | N <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> 6.96, 7.62   | 7.0                                |
|         | 8.77                    | 4.48             | 2.83             | N <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> 6.96, 7.62   | 7.0                                |
| Gly20   | 8.76                    | 3.70, 4.25       |                  |  |                                    |
|         | 8.76                    | 3.70, 4.25       |                  |  |                                    |
| Glu21   | 7.94                    | 4.26             | 2.46             | C <sup>γ</sup> H <sub>2</sub> 1.80, 2.15   | 9.2                                |
|         | 7.94                    | 4.26             | 2.46             | C <sup>γ</sup> H <sub>2</sub> 1.80, 2.15   | 9.2                                |

Таблица. Продолжение

| Остаток | Химический сдвиг, м.д.* |               |              |  | $^3J_{NH\alpha}$ , Гц |
|---------|-------------------------|---------------|--------------|--|-----------------------|
|         | NH                      | C $^\alpha$ H | C $^\beta$ H | другие протоны   |                       |
| Lys22   | 7.61                    | 4.52          | 1.82         | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 1.47; C $^\delta$ H <sub>2</sub> 1.76; C $^\epsilon$ H <sub>2</sub> 3.09; N $^\epsilon$ H <sub>3</sub> <sup>+</sup> 7.53                | 10.3                  |
|         | 7.61                    | 4.52          | 1.82         | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 1.47; C $^\delta$ H <sub>2</sub> 1.76; C $^\epsilon$ H <sub>2</sub> 3.09; N $^\epsilon$ H <sub>3</sub> <sup>+</sup> 7.53                | 10.3                  |
| Ile23   | 8.13                    | 4.74          | 1.89         | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 1.06, 1.27; C $^\gamma$ H <sub>3</sub> 0.90; C $^\delta$ H <sub>3</sub> 0.83  | 9.5                   |
|         | 8.13                    | 4.74          | 1.89         | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 1.06, 1.27; C $^\gamma$ H <sub>3</sub> 0.90; C $^\delta$ H <sub>3</sub> 0.83  | 9.5                   |
| Cys24   | 9.18                    | 5.97          | 2.98         |  | 10.1                  |
|         | 9.18                    | 5.97          | 2.98         |  | 10.1                  |
| Phe25   | 8.93                    | 6.29          | 2.82, 3.09   | H2, H6 6.83; H3, H5 7.08; H4 7.22  | 10.9                  |
|         | 8.93                    | 6.29          | 2.82, 3.09   | H2, H6 6.83; H3, H5 7.08; H4 7.22  | 10.9                  |
| Lys26   | 9.09                    | 5.14          | 1.74         | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 1.06, 1.56; C $^\delta$ H <sub>2</sub> 0.92, 1.20; C $^\epsilon$ H <sub>2</sub> 2.21, 2.47; N $^\epsilon$ H <sub>3</sub> <sup>+</sup> – | 9.6                   |
|         | 9.06                    | 5.13          | 1.70         | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 0.99, 1.53; C $^\delta$ H <sub>2</sub> 0.76, 1.12; C $^\epsilon$ H <sub>2</sub> 2.12, 2.39; N $^\epsilon$ H <sub>3</sub> <sup>+</sup> – | 9.0                   |
| Lys27   | 9.50                    | 5.21          | 1.97         | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 1.49; C $^\delta$ H <sub>2</sub> 1.60; C $^\epsilon$ H <sub>2</sub> 2.83; N $^\epsilon$ H <sub>3</sub> <sup>+</sup> –                   | 9.4                   |
|         | 9.45                    | 5.23          | 1.96         | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 1.43; C $^\delta$ H <sub>2</sub> 1.60; C $^\epsilon$ H <sub>2</sub> 2.81; N $^\epsilon$ H <sub>3</sub> <sup>+</sup> –                   | 9.8                   |
| Leu28   | 9.07                    | 4.46          | 1.59, 1.82   | C $^\gamma$ H 1.45; C $^\delta$ H <sub>3</sub> 0.67, 0.74  | 7.6                   |
|         | 9.01                    | 4.54          | 1.66, 1.85   | C $^\gamma$ H 1.51; C $^\delta$ H <sub>3</sub> 0.83, 0.88  | 7.9                   |
| His29   | 9.06                    | 4.90          | 2.93, 3.10   | H2 8.65; H4 7.21   | 8.7                   |
|         | 9.01                    | 4.75          | 2.94, 3.14   | H2 8.61; H4 7.17   | 8.7                   |
| Gln30   | 8.32                    | 4.32          | 1.69, 1.94   | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 1.82, 2.10; N $^\epsilon$ H <sub>2</sub> 6.71, 7.34   | 8.8                   |
|         | 8.45                    | 4.38          | 1.90, 2.00   | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 2.15, 2.22; N $^\epsilon$ H <sub>2</sub> –  | 7.7                   |
| Arg31   | 8.59                    | 4.21          | 1.61, 1.78   | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 1.27, 1.34; C $^\delta$ H <sub>2</sub> 3.02; N $^\epsilon$ H –  | 8.4                   |
|         | 8.34                    | 4.42          | 1.87, 1.94   | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 1.66; C $^\delta$ H <sub>2</sub> 3.25; N $^\epsilon$ H –  | 8.1                   |
| Arg32   | 7.80                    | 4.56          | 1.76, 1.92   | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 1.59; C $^\delta$ H <sub>2</sub> 3.20; N $^\epsilon$ H 7.14   | 6.9                   |
|         | 7.68                    | 4.31          | 1.66         | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 1.53, 1.70; C $^\delta$ H <sub>2</sub> 3.19; N $^\epsilon$ H 7.18   | 8.4                   |
| Pro33   |                         | 4.29          | 2.09, 2.28   | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 1.80, 1.90; C $^\delta$ H <sub>2</sub> 3.48, 3.74   |                       |
|         |                         | 4.53          | 2.14, 2.33   | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 1.45, 1.70; C $^\delta$ H <sub>2</sub> 2.81, 3.19   |                       |
| Leu34   | 8.30                    | 4.08          | 1.66, 1.82   | C $^\gamma$ H 1.60; C $^\delta$ H <sub>3</sub> 0.94  | 7.5                   |
|         | 8.48                    | 4.18          | 1.59, 1.72   | C $^\gamma$ H 1.59; C $^\delta$ H <sub>3</sub> 0.91  | 7.2                   |
| Ser35   | 7.91                    | 4.51          | 3.79, 3.79   |  | 8.9                   |
|         | 7.89                    | 4.32          | 3.96, 4.05   |  | 7.1                   |
| Trp36   | 8.21                    | 4.88          | 3.15         | H2 7.24; H4 7.58; H5 7.13; H6 7.27; H7 7.52; NH 10.03  | 10.5                  |
|         | 8.19                    | 4.69          | 3.20         | H2 7.21; H4 7.42; H5 7.14; H6 7.28; H7 7.52; NH 9.97   | 9.7                   |
| Arg37   | 7.58                    | 4.53          | 1.83         | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 1.76; C $^\delta$ H <sub>2</sub> –; N $^\epsilon$ H –   | –                     |
|         | 7.56                    | 4.46          | 1.56         | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 1.48; C $^\delta$ H <sub>2</sub> –; N $^\epsilon$ H –   | –                     |
| Tyr38   | 9.14                    | 5.37          | 2.63, 2.86   | H2, H6 6.84; H3, H5 6.92   | –                     |
|         | 8.90                    | 5.52          | 2.54, 2.90   | H2, H6 6.85; H3, H5 6.92   | 10.8                  |
| Ile39   | 9.07                    | 4.31          | 1.71         | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 1.14, 1.52; C $^\gamma$ H <sub>3</sub> 1.06; C $^\delta$ H <sub>3</sub> 0.73  | 10.2                  |
|         | 9.05                    | 4.29          | 1.71         | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 1.20, 1.61; C $^\gamma$ H <sub>3</sub> 1.06; C $^\delta$ H <sub>3</sub> 0.79  | 10.1                  |
| Arg40   | 8.31                    | 4.79          | 1.30, 1.39   | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 1.42, 1.71; C $^\delta$ H <sub>2</sub> 3.19; N $^\epsilon$ H 6.59   | 10.0                  |
|         | 8.37                    | 4.81          | 1.34, 1.42   | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 1.43, 1.74; C $^\delta$ H <sub>2</sub> 3.19; N $^\epsilon$ H 6.61   | 10.0                  |
| Gly41   | 6.27                    | 3.89, 4.00    |              |  |                       |
|         | 6.27                    | 3.89, 4.00    |              |  |                       |
| Cys42   | 8.14                    | 5.74          | 2.78, 3.25   |  | 10.5                  |
|         | 8.14                    | 5.74          | 2.78, 3.25   |  | 10.5                  |
| Ala43   | 9.47                    | 4.78          | 1.55         |  | 9.6                   |
|         | 9.47                    | 4.78          | 1.55         |  | 9.6                   |
| Asp44   | 9.02                    | 4.88          | 2.97         |  | 7.3                   |
|         | 9.02                    | 4.88          | 2.97         |  | 7.3                   |
| Thr45   | 7.38                    | 4.41          | 4.07         | C $^\gamma$ H <sub>3</sub> 1.10  | 8.5                   |
|         | 7.38                    | 4.41          | 4.07         | C $^\gamma$ H <sub>3</sub> 1.10  | 8.5                   |

Таблица. Окончание

| Остаток | Химический сдвиг, м.д.* |               |              |   | $^3J_{\text{NH}\alpha}$ , Гц |
|---------|-------------------------|---------------|--------------|---|------------------------------|
|         | NH                      | C $^\alpha$ H | C $^\beta$ H | другие протоны  |                              |
| Cys46   | 8.81                    | 4.72          | 2.95, 3.06   |   | 7.0                          |
|         | 8.81                    | 4.72          | 2.95, 3.06   |   | 7.0                          |
| Pro47   |                         | 4.25          | 1.55, 2.00   | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 1.14, 1.23; C $^\delta$ H <sub>2</sub> 3.33, 3.64  |                              |
|         |                         | 4.25          | 1.55, 2.00   | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 1.14, 1.23; C $^\delta$ H <sub>2</sub> 3.33, 3.64  |                              |
| Val48   | 7.83                    | 4.07          | 1.97         | C $^\gamma$ H <sub>3</sub> 0.94   | 8.5                          |
|         | 7.83                    | 4.07          | 1.97         | C $^\gamma$ H <sub>3</sub> 0.94   | 8.5                          |
| Gly49   | 8.32                    | 3.76, 4.26    |              |   |                              |
|         | 8.32                    | 3.76, 4.26    |              |   |                              |
| Lys50   | 8.39                    | 4.60          | 1.19         | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 1.65; C $^\delta$ H <sub>2</sub> 1.51, 1.70; C $^\epsilon$ H <sub>2</sub> –; N $^\epsilon$ H <sub>3</sub> <sup>+</sup> –       | 7.7                          |
|         | 8.39                    | 4.60          | 1.19         | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 1.65; C $^\delta$ H <sub>2</sub> 1.51, 1.70; C $^\epsilon$ H <sub>2</sub> –; N $^\epsilon$ H <sub>3</sub> <sup>+</sup> –       | 7.7                          |
| Pro51   |                         | 4.33          | 1.97, 2.40   | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 2.13, 2.21; C $^\delta$ H <sub>2</sub> 3.71, 3.92  |                              |
|         |                         | 4.33          | 1.97, 2.40   | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 2.13, 2.21; C $^\delta$ H <sub>2</sub> 3.71, 3.92  |                              |
| Tyr52   | 7.15                    | 4.52          | 3.08, 3.34   | H2, H6 6.88; H3, H5 7.10  | 8.5                          |
|         | 7.15                    | 4.52          | 3.08, 3.34   | H2, H6 6.88; H3, H5 7.10  | 8.5                          |
| Glu53   | 7.61                    | 4.42          | 2.12         | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 1.97, 2.23   | 6.8                          |
|         | 7.61                    | 4.42          | 2.12         | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 1.97, 2.23   | 6.8                          |
| Met54   | 8.08                    | 4.34          | 2.15, 2.23   | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 2.59, 2.70; C $^\epsilon$ H <sub>3</sub> 2.75  | 6.9                          |
|         | 8.08                    | 4.34          | 2.15, 2.23   | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 2.59, 2.70; C $^\epsilon$ H <sub>3</sub> 2.75  | 6.9                          |
| Ile55   | 8.37                    | 4.55          | 1.71         | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 0.93, 1.61; C $^\gamma$ H <sub>3</sub> 0.92; C $^\delta$ H <sub>3</sub> 0.71   | 8.1                          |
|         | 8.37                    | 4.55          | 1.71         | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 0.93, 1.61; C $^\gamma$ H <sub>3</sub> 0.92; C $^\delta$ H <sub>3</sub> 0.71   | 8.1                          |
| Glu56   | 8.97                    | 4.86          | 2.06, 2.13   | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 2.27, 2.51   | 10.2                         |
|         | 8.97                    | 4.86          | 2.06, 2.13   | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 2.27, 2.51   | 10.2                         |
| Cys57   | 8.99                    | 5.51          | 2.99, 3.75   |   | 9.8                          |
|         | 8.99                    | 5.51          | 2.99, 3.75   |   | 9.8                          |
| Cys58   | 9.32                    | 5.16          | 3.53, 3.62   |   | 8.1                          |
|         | 9.32                    | 5.16          | 3.53, 3.62   |   | 8.1                          |
| Ser59   | 9.05                    | 5.08          | 4.02, 4.20   |   | 9.3                          |
|         | 9.05                    | 5.08          | 4.02, 4.20   |   | 9.3                          |
| Thr60   | 7.59                    | 4.73          | 4.34         | C $^\gamma$ H <sub>3</sub> 1.22   | 9.5                          |
|         | 7.59                    | 4.73          | 4.34         | C $^\gamma$ H <sub>3</sub> 1.22   | 9.5                          |
| Asp61   | 8.28                    | 4.82          | 2.36, 2.57   |   | <5                           |
|         | 8.28                    | 4.82          | 2.36, 2.57   |   | <5                           |
| Lys62   | 9.47                    | 3.42          | 1.80, 1.88   | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 0.68, 1.04; C $^\delta$ H <sub>2</sub> 1.27; C $^\epsilon$ H <sub>2</sub> 2.36; N $^\epsilon$ H <sub>3</sub> <sup>+</sup> 7.05 | 8.1                          |
|         | 9.47                    | 3.42          | 1.80, 1.88   | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 0.68, 1.04; C $^\delta$ H <sub>2</sub> 1.27; C $^\epsilon$ H <sub>2</sub> 2.36; N $^\epsilon$ H <sub>3</sub> <sup>+</sup> 7.05 | 8.1                          |
| Cys63   | 7.74                    | 4.41          | 3.34, 3.75   |   | 6.4                          |
|         | 7.74                    | 4.41          | 3.34, 3.75   |   | 6.4                          |
| Asn64   | 9.28                    | 4.67          | 2.17, 2.57   | N $^\delta$ H <sub>2</sub> 7.75, 7.82   | 7.9                          |
|         | 9.28                    | 4.67          | 2.17, 2.57   | N $^\delta$ H <sub>2</sub> 7.75, 7.82   | 7.9                          |
| Arg65   | 7.40                    | 3.72          | 1.75, 1.82   | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 1.67, 1.80; C $^\delta$ H <sub>2</sub> 3.32; N $^\epsilon$ H 7.26  | 7.0                          |
|         | 7.42                    | 3.74          | 1.75, 1.82   | C $^\gamma$ H <sub>2</sub> 1.67, 1.80; C $^\delta$ H <sub>2</sub> 3.32; N $^\epsilon$ H 7.26  | 7.0                          |

\* Курсивом обозначены химические сдвиги и КССВ протонов *цис*-формы токсина WTX.

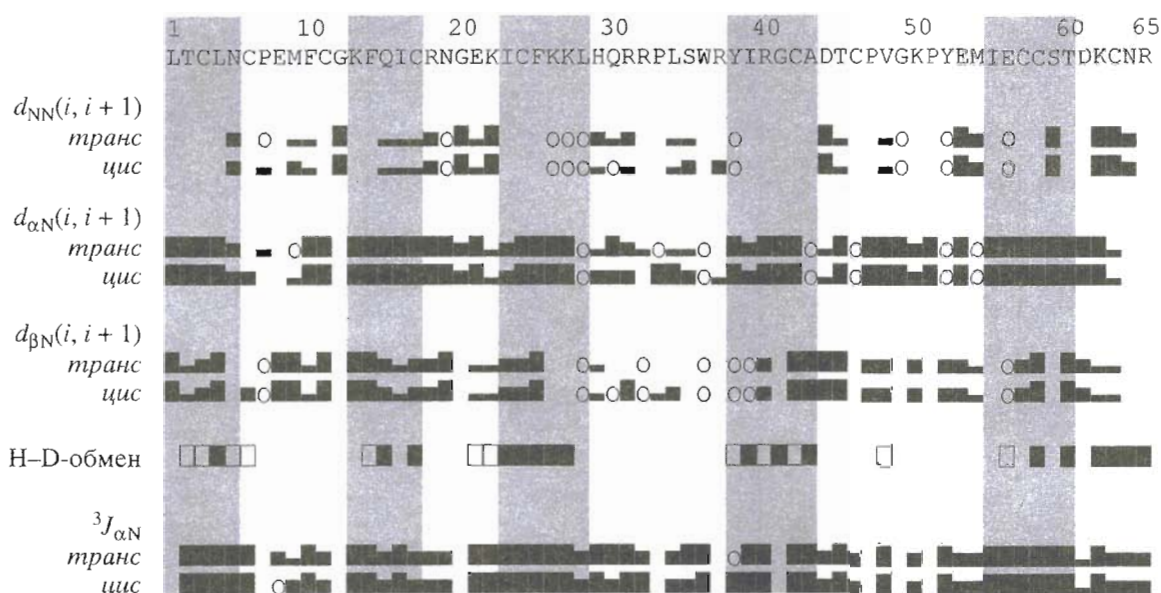


Рис. 2. Аминокислотная последовательность WTX, карта  $d$ -связей с участием  $\text{NH}$ -,  $\text{C}^\alpha\text{H}$ - и  $\text{C}^\beta\text{H}$ -протонов, данные о скоростях обмена амидных протонов на дейтерий растворителя (H-D-обмен) и КССВ протонов  $\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H}$  ( $^3J_{\alpha\text{N}}$ ). Высота прямоугольников характеризует величину ЯЭО-контактов (сильные, средние и слабые) и величину  $^3J_{\alpha\text{N}}$  ( $> 8$  Гц,  $6-8$  Гц и  $< 6$  Гц), "O" – отсутствие данных. При описании скоростей обмена амидных протонов использованы обозначения: черный прямоугольник – остатки, амидные протоны которых обмениваются медленно (сигналы присутствуют в последнем спектре TOCSY, снятом через 4341 мин после растворения в  $\text{D}_2\text{O}$ ); пустой прямоугольник – остатки, амидные протоны которых характеризуют промежуточную скорость обмена; амидные протоны остальных остатков обмениваются быстро (сигналы отсутствуют в первом спектре TOCSY, снятом через 58 мин после растворения в  $\text{D}_2\text{O}$ ). Серым фоном обозначены  $\beta$ -структурные участки.

Последовательное отнесение сигналов показало, что все спиновые системы соответствуют одной полипептидной цепи, значит, мы имеем дело с двумя конформационными состояниями токсина. Остаткам 1–3, 11, 12, 14–25 и 41–64 соответствует по одной спиновой системе, а четырем участкам, включающим остатки 4–10, 13, 26–40 и 65 – по две спиновые системы. На этом этапе возможности последовательного отнесения оказались исчерпаны, поскольку оно не позволяло установить корреляцию между участками двоящихся спиновых систем и определить их принадлежность к одной из двух конформаций токсина. Однозначное соответствие между четырьмя участками двоящихся спиновых систем было установлено с помощью дальних ЯЭО-контактов между спиновыми системами остатков Cys6 и Arg65, Cys6 и Lys13, Met9 и Trp38. Также ЯЭО-контакты между остатками Leu28 и Trp38 позволили разрешить неоднозначность, возникшую из-за отсутствия последовательных контактов между Trp36 и Arg37.

В итоге удалось разделить спиновые системы на две группы (таблица), соответствующие двум конформациям токсина WTX в растворе. Поскольку две конформации WTX представлены в спектрах  $^1\text{H}$ -ЯМР сигналами приблизительно равной интенсивности, мы не можем их разделить на

минорную и основную. Но так как очевидным отличием между ними является *транс*- или *цис*-конфигурация пептидной связи Arg32–Pro33, то далее мы будем обозначать их как *транс*- и *цис*-форма, соответственно (рис. 4).

В результате отнесения к определенным остаткам в аминокислотной последовательности были найдены последовательные контакты ЯЭО для всей цепи, кроме двух случаев (рис. 2). В *цис*-форме ожидаемый кросс-пик между протонами  $\text{C}^\alpha\text{H}$  Trp36 и  $\text{NH}$  Arg37 перекрыт, а в *транс*-форме подавлен вместе с сигналом воды. Вследствие очень сильного уширения сигнала  $\text{NH}$ -протона остатка Trp38 в *транс*-форме не удалось определить последовательные контакты между ним и остатком Arg37.

Из-за уширения сигналов очень низкую интенсивность имеют кросс-пики между протонами остатков Pro7 и Glu8:  $\text{C}^\alpha\text{H}/\text{NH}$  в *транс*-форме и  $\text{C}^\beta\text{H}/\text{NH}$  в *цис*-форме. Другая сложность при последовательном отнесении заключалась в совпадении химических сдвигов  $\text{NH}$ -протонов остатков Leu28 и His29 как в *транс*-, так и в *цис*-форме. Остатки Cys46 и Pro47 были отнесены по последовательным ЯЭО-контактам  $\text{C}^\alpha\text{H}-\text{C}^\beta\text{H}$  в спектре NOESY

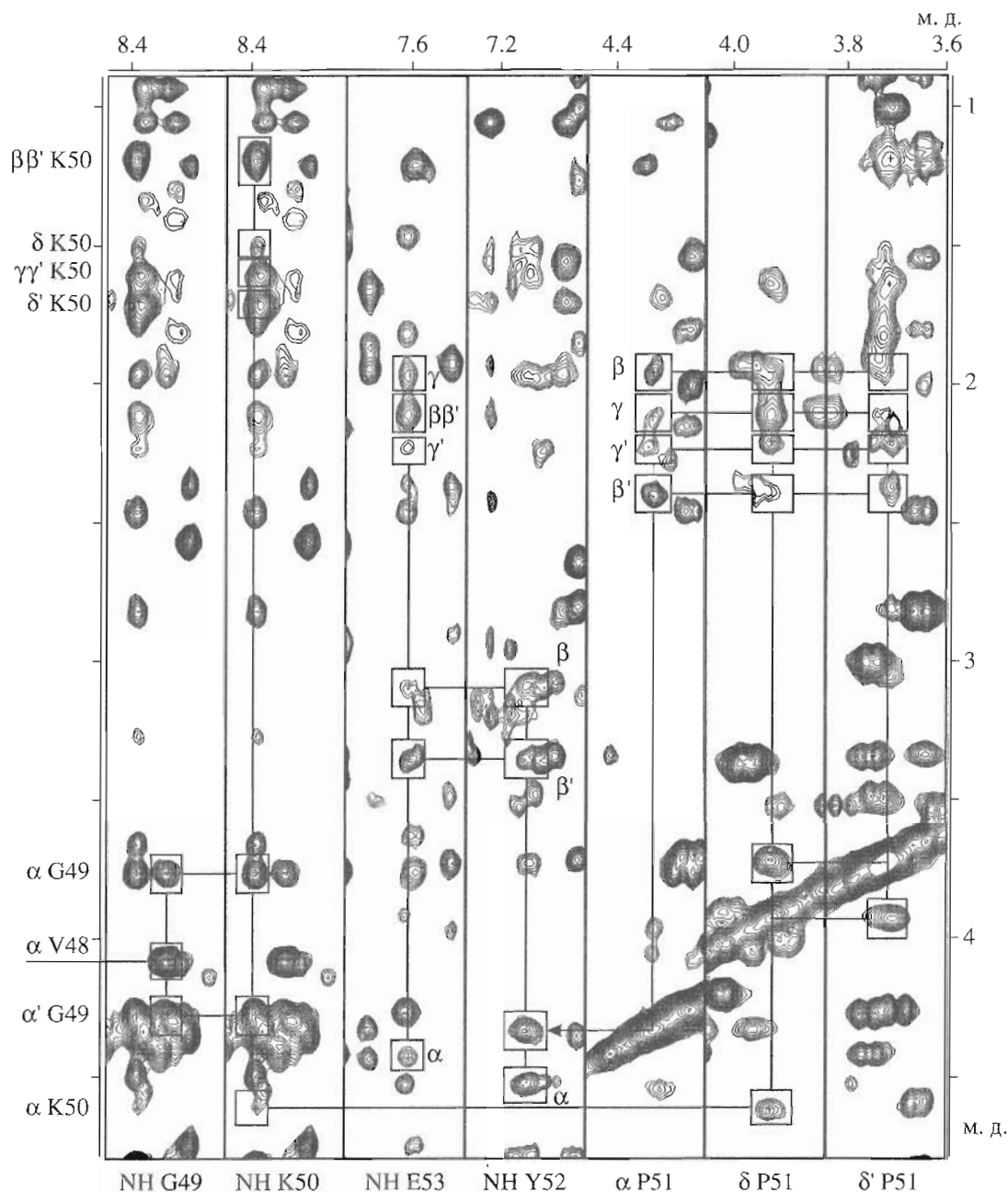


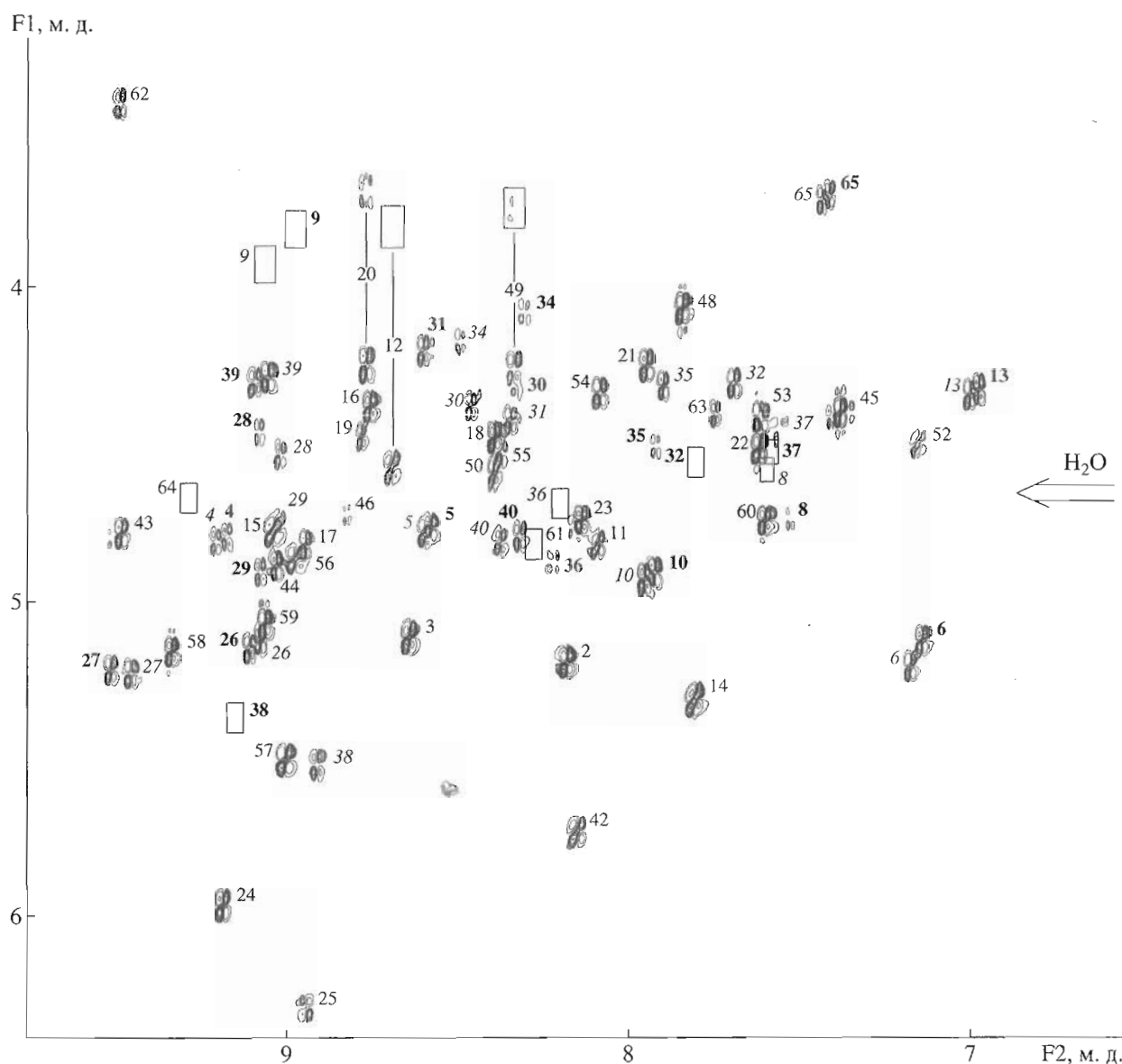
Рис. 3. Фрагменты спектра NOESY (200 мс, 40°C), использованные при последовательном отнесении сигналов остатков 49–53 WTХ. Прямоугольниками отмечены внутривосточные и последовательные кросс-пики.

при 30°C, так как при 40°C сигнал  $^1\text{H}$ -протона Cys46 совпадал с сигналом воды.

Наибольшие различия в химических сдвигах и константах спин-спинового взаимодействия  $^3J_{\alpha\text{N}}$  для двух конформаций наблюдаются у протонов на участке 26–40 (таблица, рис. 5), что объясняется *цис-транс*-изомеризацией пептидной связи Arg32–Pro33. Изменения химических сдвигов протонов остатков в *N*-концевой области не столь значительны (таблица, рис. 5), а  $^3J_{\alpha\text{N}}$

Cys6 в обеих формах практически равны. Это согласуется с выводом о *транс*-конфигурации связи Cys6–Pro7 в обеих формах. Тем не менее в *N*-концевой области происходят конформационные изменения основной цепи, на что указывают: 1) разные интенсивности контактов  $d_{\alpha\text{N}}$  и  $d_{\delta\text{N}}$  между Pro7 и Glu8 в двух формах, наблюдаемых в спектрах NOESY, снятых при 50°C; 2) разные КССВ  $^3J_{\alpha\text{N}}$  Met9; 3) изменения химических сдвигов среди протонов основной цепи остатков





**Рис. 4.** NH-C $\alpha$ H-область спектра DQF-COSY в H<sub>2</sub>O. Жирным шрифтом отмечены кросс-пики, соответствующие *транс*-форме токсина, курсивом – *цис*-форме, а обычным шрифтом – совпадающие в обеих формах. Стрелка указывает положение резонанса воды. Прямоугольниками отмечены положения малоинтенсивных сигналов.

Glu8, Met9 и Phe10 больше, чем среди протонов боковых цепей. Вероятно, эти изменения связаны с пространственной близостью *N*-концевой области и участка 26–40.

Представление о вторичной структуре белка можно получить из анализа совокупности таких характеристик, как *d*-связи,  $^3J_{\alpha N}$ , специфические дальние контакты и скорости обмена амидных протонов на дейтерий растворителя. Большое число сильных  $d_{\alpha N}$ - и  $d_{\beta N}$ -связей при редкой встречаемости  $d_{NN}$ -связей и значения  $^3J_{\alpha N} > 8$  Гц (рис. 2) указывают на то, что WTX, как и  $\alpha$ -NT змей длинного и короткого типа, является преимуществен-

но  $\beta$ -структурным белком. При подробном анализе дальних ЯЭО-контактов можно видеть, что вторичная структура обеих форм WTX сформирована двумя  $\beta$ -слоями. Первый  $\beta$ -слой включает два антипараллельных  $\beta$ -тяжа, образованных участками 1–5 и 13–17. Второй состоит из трех антипараллельных  $\beta$ -тяжей: участки 23–28, 38–43 и 55–59 (рис. 6).

Первый  $\beta$ -слой характеризуют, прежде всего, интенсивные кросс-пики между C $\alpha$ H-протонами остатков Thr2 и Ile16, Leu4 и Phe14. Очень медленный обмен амидных протонов Gln15 и Cys17 на дейтерий растворителя свидетельствует об их

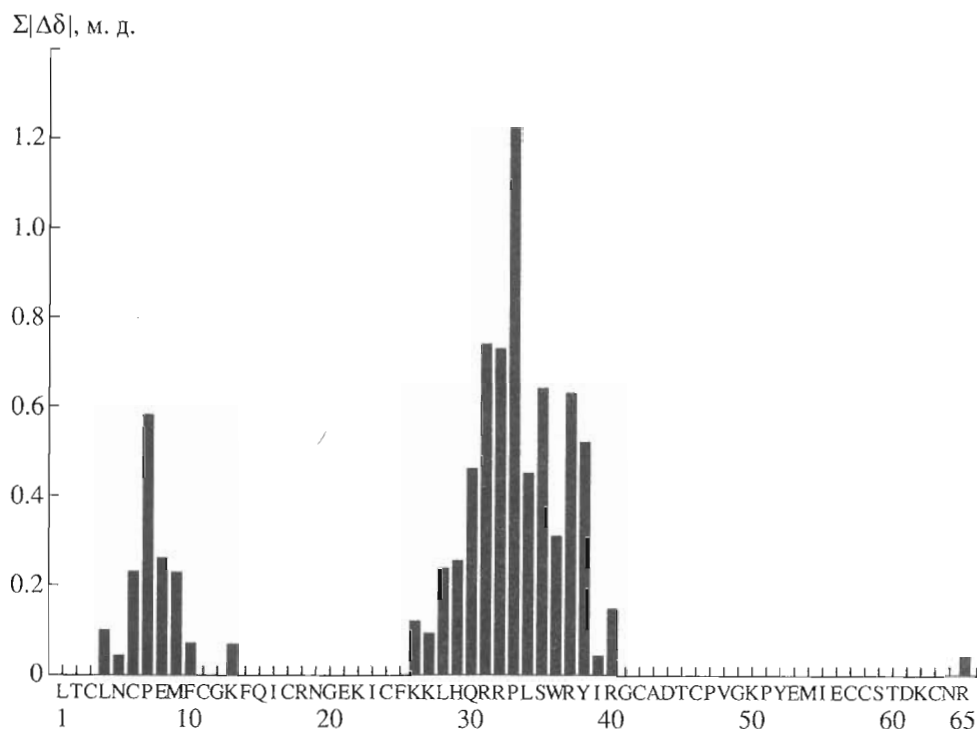


Рис. 5. Гистограмма суммарных различий химических сдвигов  $C^{\alpha}H$ -,  $C^{\beta}H$ - и  $NH$ -протонов ( $C^{\delta}H$ -протонов в случае пролина) для *транс*- и *цис*-форм WTХ.

участии в образовании водородных связей, стабилизирующих  $\beta$ -слой.

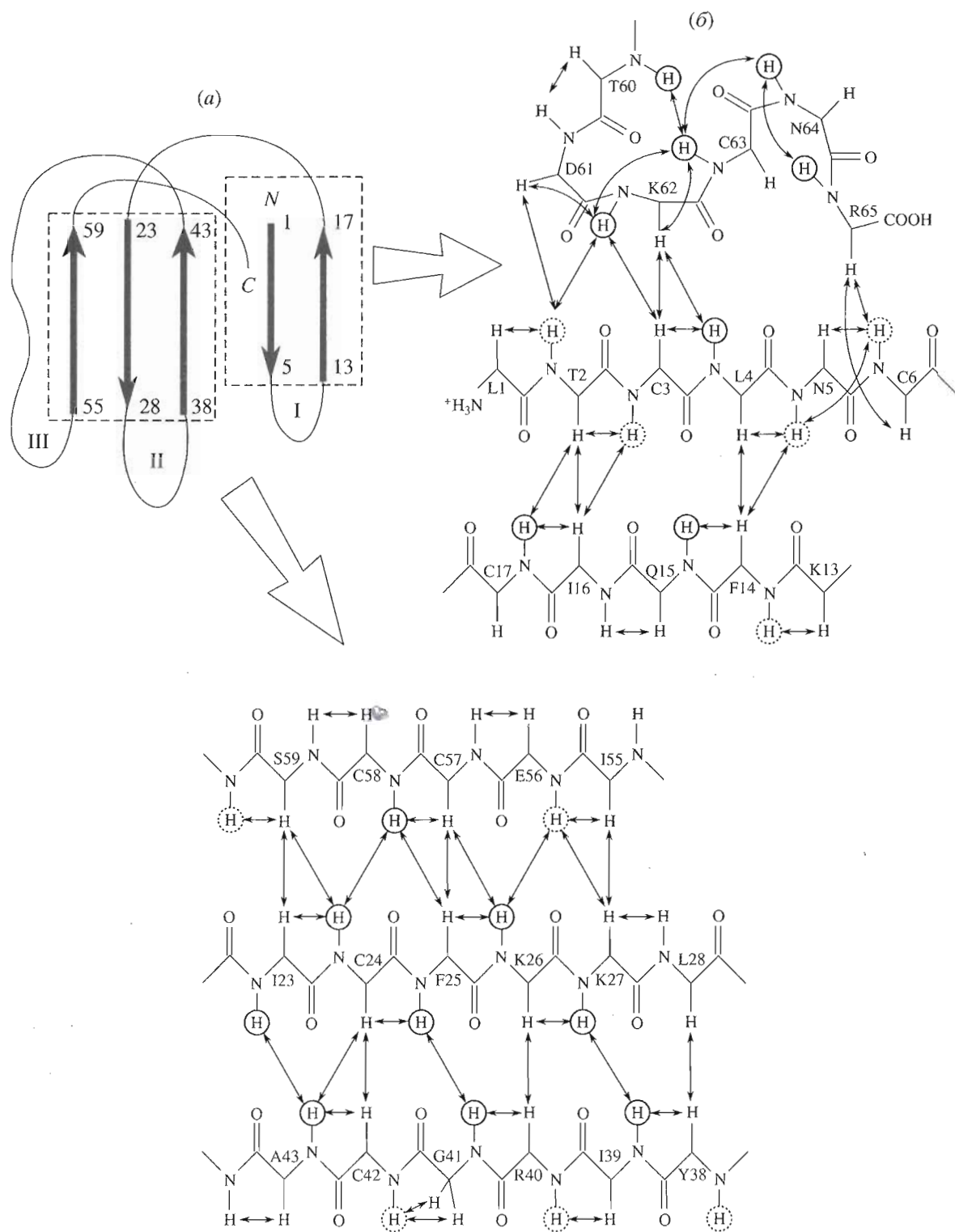
Интересно, что структура первой петли WTХ схожа с пространственной структурой первой петли белка CD59 [11]. В обеих молекулах  $\beta$ -слой в первой петле оканчивается на остатках Cys6–Pro7, несмотря на то, что петля в CD59 длиннее на два остатка. Для WTХ и CD59 [11] не были обнаружены ЯЭО-контакты между протонами основной цепи первой и второй петель, присутствующие, например, в коротком  $\alpha$ -нейротоксине II из яда *Naja oxiana* [19].

Второй  $\beta$ -слой подтверждается дальними контактами ЯЭО между  $C^{\alpha}H$ -протонами и замедленными скоростями обмена амидных протонов на дейтерий растворителя (рис. 2, 6). Замедленный обмен наблюдается у амидных протонов всех остатков центрального тяжа (23–28), кроме Leu28, тогда как во внешних тяжах медленно обменивающиеся  $NH$ -протоны чередуются с быстро обменивающимися. Отметим, что тяжи второго  $\beta$ -слоя короче, чем у гомологичных  $\alpha$ -NT короткого типа и СТ (см., например, [19, 20]).

На участке 60–65 замедленный обмен  $NH$ -протонов на дейтерий растворителя наблюдается у всех остатков, кроме Asp61. Для этого участка характерна плотная сеть последовательных и дальних контактов, в том числе и с протонами первой

петли (рис. 6). Аналогичная ситуация наблюдалась в гомологичных белках –  $\alpha$ -нейротоксине II и цитотоксине II [19, 20]. Близость  $C$ -концевого остатка Arg65 к первой петле (рис. 6) объясняет наличие у него двух кросс-пиков  $NH-C^{\alpha}H$  в спектре DQF-COSY (рис. 4). Такая картина ЯЭО-контактов и скоростей обмена амидных протонов на дейтерий показывает, что участок 60–65 образует компактную структуру, прилегающую к основаниям первой и второй петель.

Участки 6–12 и 29–37 первой и второй петли, соответственно, образуют, по-видимому, нерегулярные пространственные структуры, включающие в себя компактные изгибы. При этом они дополнительно участвуют в более быстром, чем *цис-транс*-изомеризация, конформационном обмене, который приводит к увеличению ширины сигналов в спектрах  $^1H$ -ЯМР при 30°C по сравнению с шириной сигналов в спектрах при 40 и 50°C. Укладка этих участков полипептидной цепи в двух конформационных состояниях WTХ выяснится при расчете пространственной структуры. Не исключено, что конформационная гетерогенность WTХ является характерной чертой всех слабых токсинов и имеет функциональное значение.



**Рис. 6.** Схема укладки полипептидной цепи WTX; обозначены *N*- и *C*-концы токсина, римские цифры соответствуют нумерации петель (а) и ЯЭО-контакты (показаны двунаправленными стрелками) между протонами основной цепи в двух  $\beta$ -тяжах (б). Медленно обменивающиеся с дейтерием растворителя амидные протоны, т.е. наблюдаемые в последнем спектре TOCSY, снятом через 4341 мин после растворения в  $D_2O$ , обведены сплошными кружками. Амидные протоны, обменивающиеся с промежуточной скоростью, обведены пунктирными кружками. Остальные амидные протоны обмениваются быстро (сигналы отсутствовали в первом спектре TOCSY, снятом через 58 мин после растворения в  $D_2O$ ).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

WТХ был выделен как описано в работе [16], аналогично работе [4]. Для съемки  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектров 5 мг лиофилизованного токсина растворяли в 0.6 мл 10%  $\text{D}_2\text{O}$  или 100%  $\text{D}_2\text{O}$ , pH 2.9.

$^1\text{H}$ -ЯМР спектры WТХ снимали на спектрометре Unity 600 (Varian, США) с частотой резонанса протонов 600 МГц. Были получены следующие 2D-спектры. При 30°C в  $\text{H}_2\text{O}$ : DQF-COSY [21], NOESY [22] (200 мс), TOCSY [23] (80 мс). При 40°C: DQF-COSY в  $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{D}_2\text{O}$ , NOESY (100 мс в  $\text{H}_2\text{O}$ , 200 мс в  $\text{D}_2\text{O}$ ), TOCSY (50 мс в  $\text{H}_2\text{O}$ , 40 мс в  $\text{D}_2\text{O}$ ). При 50°C: NOESY (200 мс), TOCSY (80 мс). Период детектирования обычно составлял 1 с, число эквидистантных точек по двум направлениям составляло 16384 и 600 в случае DQF-COSY, а для остальных спектров – 8192 и 400. Для отнесения сигналов спектры были преобразованы с разрешением  $8192 \times 4096$  (DQF-COSY) и  $4096 \times 2048$  (NOESY, TOCSY) точек. Ширина спектров по каждому направлению составляла 10 кГц.

Для отнесения сигналов в основном использовались спектры, снятые при 40°C. Химические сдвиги протонов отсчитывались от сигнала воды, чей химический сдвиг считался равным 4.75 м.д. (30°C), 4.65 м.д. (40°C) и 4.55 м.д. (50°C).

Для измерения скоростей обмена амидных протонов на дейтерий растворителя образец был лиофилизован из  $\text{H}_2\text{O}$  и растворен в  $\text{D}_2\text{O}$ . Одиннадцать экспериментов TOCSY с временем смешивания 40 мс стартовали спустя 58, 244, 379, 561, 744, 926, 1108, 1408, 1574, 2706 и 4341 мин после растворения образца. В промежутках между 2D-экспериментами были сняты 9 одномерных спектров  $^1\text{H}$ -ЯМР.

Для измерения вицинальных констант спин-спинового взаимодействия  $^3J_{\alpha\text{N}}$  использовались спектры DQF-COSY, TOCSY и NOESY, преобразованные с разрешением  $32768 \times 8192$  (DQF-COSY) и  $16384 \times 4096$  (NOESY, TOCSY) точек. Измерение  $^3J_{\alpha\text{N}}$  проводили в программе Mathematica [24] методом нелинейной аппроксимации или с помощью программы Infit [25] из пакета XEASY.

Преобразование спектров производилось с помощью программы VNMR (Varian Software, США) на рабочих станциях SUN UltraSparc и SGI O2. Анализ спектров и отнесение сигналов осуществлялось с помощью программы XEASY [26].

Настоящая работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 98-04-48685).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Endo T., Tamiya N. // Snake Toxins / Ed. A.L. Harvey. New York: Pergamon Press, 1991. P. 165–222.
2. Bilwes A., Rees B., Moras D., Menez R., Menez A. // J. Mol. Biol. 1994. V. 239. P. 122–136.
3. Tsetlin V. // Eur. J. Biochem. 1999. V. 264. P. 281–286.
4. Joubert F., Taljaard N. // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1980. V. 361. P. 425–436.
5. Joubert F.J., Taljaard N. // Eur. J. Biochem. 1978. V. 90. P. 359–367.
6. Carlsson F. // Biochim. Biophys. Acta. 1975. V. 400. P. 310–321.
7. Shafqat J., Siddiqi A., Zaidi Z., Jornavall H. // FEBS Lett. 1991. V. 284. P. 70–72.
8. Joubert F.J. // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1975. V. 356. P. 1901–1908.
9. Strydom A.J.C., Botes D.P. // J. Biol. Chem. 1971. V. 246. P. 1341–1349.
10. Arnberg H., Eaker D., Fryklund L., Karlsson E. // Biochim. Biophys. Acta. 1974. V. 359. P. 222–232.
11. Kieffer B., Driscoll P., Campbell I., Willis A., van der Merwe P., Davis S. // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 4471–4482.
12. Gumley T., McKenzie I., Sandrin M. // Immunol. Cell Biol. 1995. V. 73. P. 277–296.
13. Miwa J., Ibanez-Tallon I., Crabtree G., Sanchez R., Sali A., Role L., Heintz N. // Neuron. 1999. V. 23. P. 105–114.
14. Fryklund L., Eaker D. // Biochemistry. 1975. V. 14. P. 2865–2871.
15. Grishin E.V., Sukhikh A.P., Adamovich T.B., Ovchinnikov Yu.A. // FEBS Lett. 1974. V. 48. P. 179–183.
16. Кухтина В.В., Вайзе К., Осипов А.В., Старков В.Г., Титов М.И., Есипов С.Е., Овчинникова Т.В., Цетлин В.И., Уткин Ю.Н. // Биоорг. химия. 2000. Т. 26. С. 803–807.
17. Wutrich K. // NMR of Proteins and Nucleic Acids. New York: John Wiley and Sons, 1986.
18. Utkin Y.N., Kukhtina V.V., Maslennikov I.V., Eletsky A.V., Starkov V.G., Weise C., Franke P., Hucho F., Tsetlin V.I. // Toxicon. 2000 (in press).
19. Golovanov A., Lomize A., Arseniev A., Utkin Yu., Tsetlin V. // Eur. J. Biochem. 1993. V. 213. P. 1213–1223.
20. Деметьева Д., Уткин Ю., Арсеньев А. // Биоорг. химия. 1996. Т. 22. С. 339–352.
21. Rance M., Sorensen O.W., Bodenhausen G., Wagner A., Ernst R.R., Wutrich K. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1983. V. 117. P. 479–485.
22. Jeener J., Meier G.H., Bachman P., Ernst R.R. // J. Chem. Phys. 1979. V. 71. P. 4546–4553.
23. Bax A., Davis D.G. // J. Magn. Reson. 1985. V. 48. P. 286–292.
24. Wolfram S. // The Mathematica Book, 4th ed. Champaign, Cambridge, Melbourne: Wolfram Media/Cambridge University Press, 1999.
25. Szyperski T., Guntert P., Otting G., Wutrich K. // J. Magn. Reson. 1992. V. 99. P. 552–560.
26. Eccles C., Xia T.H., Billeter M., Wutrich K. // J. Biomol. NMR. 1991. V. 1. P. 111–130.

## Structure and Conformational Heterogeneity of a Weak Toxin from the Cobra *Naja kaouthia* Venom

A. V. Eletsky, I. V. Maslennikov, V. V. Kukhtina, Yu. N. Utkin, V. I. Tsetlin, and A. S. Arseniev<sup>#</sup>

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia*

Resonances in the two-dimensional <sup>1</sup>H NMR spectra of a weak toxin (WTX) from the venom of cobra *Naja kaouthia* for all 65 amino acid residues were assigned. The amino acid sequence of WTX, determined by the sequential assignment of spin systems, was found to be similar to that of the CM-9a toxin from the *N. kaouthia* venom. Unlike CM-9a, WTX contains an additional Trp36 residue; Lys50 and Tyr52 are interchanged; and there is a Thr residue in place of Arg2. For some residues of WTX, the presence of two components of approximately equal intensities in the spectra was shown, which is explained by the conformational heterogeneity of the polypeptide owing to the *cis–trans* isomerization of the peptide bond Arg32–Pro33. The data (contacts of the nuclear Overhauser effect, constants of spin–spin coupling of protons, and rates of exchange of amide protons by deuterium of the solvent) made it possible to determine the secondary structure of two forms of WTX, which is characterized by the presence of two antiparallel β-sheets, one of which consists of two strands (regions 1–5 and 13–17) and the other, of three strands (regions 23–28, 38–43, and 55–59).

*Key words: NMR; toxins, weak; proteins, secondary structure, conformational heterogeneity*

---

<sup>#</sup> *To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 330–5929; e-mail: aars@nmr.ru.*

The full English version of the paper is published in *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 2, and is also available (free) at <http://www.maik.ru/>.