



УДК 547.993:543.422.23

ЯМР-ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОГО СТРОЕНИЯ ЦЕНТРАЛЬНОЙ ПЕТЛИ «КОРОТКИХ» НЕЙРОТОКСИНОВ ЗМЕЙ В РАСТВОРЕ

Паишков В. С., Арсеньев А. С., Уткин Ю. Н.,
Цетлин В. И., Ёлыстров В. Ф.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Исследованы спектры ^1H -ЯМР нейротоксина II *Naja naja oxiana* и нейротоксина III *Naja mossaibica mossaibica*, а также четырех производных нейротоксина II: с тринитрофенильной меткой на ϵ -аминогруппе Lys^{27} и моноспин-меченные по ϵ -аминогруппам Lys^{26} или Lys^{27} радикалом пиперидинового ряда, а также Lys^{27} -производное, модифицированное спиновой меткой пирролилового ряда. Изучены спектры ЭПР этих трех моноспин-меченных производных нейротоксина II. Показано, что в растворе молекулы нейротоксинов II и III имеют сходное пространственное строение. Охарактеризовано локальное окружение аминокислотных остатков, входящих в состав центральной петли этих токсинов. Времена корреляции и активационные параметры вращательного движения спиновых меток на ϵ -аминогруппах Lys^{26} и Lys^{27} свидетельствуют о том, что эти спиновые метки локализованы на поверхности белковой глобулы. По вкладам во времена релаксации протонов нейротоксина II, индуцированным неспаренным электроном спиновых меток, вычислены расстояния от иминоксильных радикалов до отдельных протонов нейротоксина II.

В совокупности полученные результаты показывают, что в растворе центральная петля «коротких» нейротоксинов представляет собой антипараллельную β -структуру с β -изгибом в районе 31–34-го аминокислотных остатков и что протонирование имидазольного кольца остатка His^{32} сопровождается локальным конформационным переходом, в процессе которого имидазольное кольцо удаляется от спиновой метки на остатке Lys^{27} .

«Короткие» нейротоксины — большая группа низкомолекулярных белков, выделяемых из ядов морских и сухопутных змей [1]. Связываясь с ацетилхолиновым рецептором постсинаптической мембраны, эти токсины блокируют передачу нервного импульса. «Короткие» нейротоксины состоят из 60–62 аминокислотных остатков, соединенных четырьмя дисульфидными связями (рис. 1). Анализ первичных структур нейротоксинов выявил значительную гомологию между ними: выделены структурно и функционально инвариантные аминокислотные остатки [1]. Предполагается, что первые существенны для сохранения активной структуры молекулы, вторые ответственны за взаимодействие с рецептором.

Спектры ДОВ и КД водных растворов «коротких» нейротоксинов свидетельствуют о сходстве пространственного строения этих молекул, характеризующихся высоким содержанием β -структуры и отсутствием α -спиральных участков [8–13]. Аналогичные данные были получены при исследовании спектров комбинационного рассеяния света [14–15]. Изучение спектров ^1H -ЯМР этих нейротоксинов также показывает, что эквивалентные по аминокислотной последовательности остатки имеют практически одинаковое локальное окружение [16–22].

В целом спектральные данные указывают на то, что «короткие» нейротоксины в растворах сохраняют основные черты пространственного строения одного из представителей этого ряда эрабутоксина *b* (*L. semifasciata*) в кристалле, установленные рентгеноструктурным анализом [23–26].

Настоящая работа продолжает начатые нами ранее исследования методом спектроскопии ЯМР динамической стереохимии «коротких» нейротоксинов в растворе, в ходе которых было оценено локальное окружение ароматических аминокислотных остатков нейротоксина II *N. n. oxiana* и

	1	5	10	15	20	25	30																								
1.	L	E	C	H	N	Q	Q	S	S	Q	P	P	T	K	T	C	S	G	E	T	N	C	Y	K	K	W	W	S	D		
2.	L	E	C	H	N	Q	Q	S	S	Q	P	P	T	K	T	C	P	G	E	T	N	C	Y	K	K	V	W	R	D		
3.	L	N	C	H	N	Q	M	S	A	Q	P	P	T	T	T	R	C	S	R	W	E	T	N	C	Y	K	K	R	W	R	D
4.	L	E	C	H	N	Q	Q	S	S	E	P	P	T	T	T	R	C	S	G	G	E	T	N	C	Y	K	K	R	W	R	D
5.	L	E	C	H	N	Q	Q	S	S	Q	T	P	T	T	T	G	C	S	G	G	E	T	N	C	Y	K	K	R	W	R	D
6.	R	I	C	F	N	Q	H	S	S	Q	P	G	T	T	K	T	C	P	S	G	E	S	S	C	Y	N	K	Q	W	S	D
7.	R	I	C	F	N	Q	H	S	S	Q	P	G	T	T	K	T	C	P	S	G	E	S	S	C	Y	H	K	Q	W	S	D
8.	R	I	C	F	N	Q	H	S	S	Q	P	G	T	T	K	T	C	P	S	G	E	S	S	C	Y	H	K	Q	W	S	D

	32	35	40	45	50	55	60																								
1.	H	R	G	T	I	I	E	R	G	C	G	C	P	K	V	K	P	G	V	N	L	N	C	C	R	T	D	R	C	N	N
2.	H	R	G	T	I	I	E	R	G	C	G	C	P	T	V	K	P	G	I	K	L	N	C	C	T	T	D	K	C	N	N
3.	H	R	G	Y	R	T	E	R	G	C	G	C	P	T	V	K	K	G	I	Q	L	H	C	C	T	S	D	N	C	N	N
4.	H	R	G	Y	R	T	E	R	G	C	G	C	P	T	V	K	K	G	I	E	L	N	C	C	T	T	D	R	C	N	N
5.	H	R	G	Y	R	T	E	R	G	C	G	C	P	S	V	K	N	G	I	E	I	N	C	C	T	T	D	R	C	N	N
6.	F	R	G	T	I	I	E	R	G	C	G	C	P	T	V	K	P	G	I	K	L	S	C	C	E	S	E	V	C	N	N
7.	F	R	G	T	I	I	E	R	G	C	G	C	P	T	V	K	P	G	I	K	L	S	C	C	E	S	E	V	C	N	N
8.	F	R	G	T	I	I	E	R	G	C	G	C	P	T	V	K	P	G	I	N	L	S	C	C	E	S	E	V	C	N	N

Рис. 1. Первичная структура «коротких» нейротоксинов (в однобуквенном коде), исследованных методом ЯМР: 1 — нейротоксин II (*Naja naja oxiana*) [2], 2 — α -токсин (*Naja nigricollis*) [3], 3 — нейротоксин III (*Naja mossambica mossambica*) [4], 4 — нейротоксин I (*N. m. mossambica*) [4], 5 — кобротоксин (*Naja naja atra*) [5], 6 — эрабутоксин а (*Laticauda semifasciata*) [6], 7 — эрабутоксин б (*L. semifasciata*) [7], 8 — эрабутоксин с (*L. semifasciata*) [8]. Аминокислотные остатки, инвариантные для всех «коротких» нейротоксинов, обведены рамками. Дисульфидные мостики образованы остатками Cys³ — Cys²⁴, Cys¹⁷ — Cys⁴¹, Cys⁴³ — Cys⁵⁴, Cys⁵⁵ — Cys⁶⁰

α -токсина *N. nigricollis* [16, 20], а также микроокружения трифторацетильных групп, введенных по аминокислотам нейротоксина II *N. n. oxiana* [27].

Основное внимание уделено установлению пространственного строения и конформационных возможностей центральной петли нейротоксина II *N. n. oxiana* — одного из участков молекулы, который находится в контакте с ацетилхолиновым рецептором [28], и выяснению локального окружения спиновых меток, селективно введенных по ϵ -аминогруппам остатков Lys²⁶ и Lys²⁷, которые сильно различаются по характеру взаимодействия с рецептором [28, 29] (используется нумерация по гомологичному ряду «коротких» нейротоксинов [4], согласно которой в аминокислотной последовательности нейротоксина II имеется делеция в положении 19).

1. Отнесение сигналов

Реализация потенциальных возможностей спектроскопии ЯМР применительно к исследованию пространственного строения и конформационной подвижности пептидно-белковых молекул в растворах в значительной степени определяется тем, насколько полно проведено выделение и отнесение сигналов в спектрах ЯМР. Только после этого становится возможным, анализируя поведение соответствующих сигналов, получить представление о структурно-динамических особенностях локального окружения конкретных групп молекулы.

Ароматическая область спектров ¹H-ЯМР нейротоксина II *N. n. oxiana* и нейротоксина III *N. m. mossambica* представлена на рис. 2. Ранее мы провели отнесение сигналов от протонов ароматических СН-групп в спектрах ¹H-ЯМР (300 МГц) нейротоксина II, а также сигналов от протонов индольных NH-групп остатков триптофана (в спектрах ¹H-ЯМР при

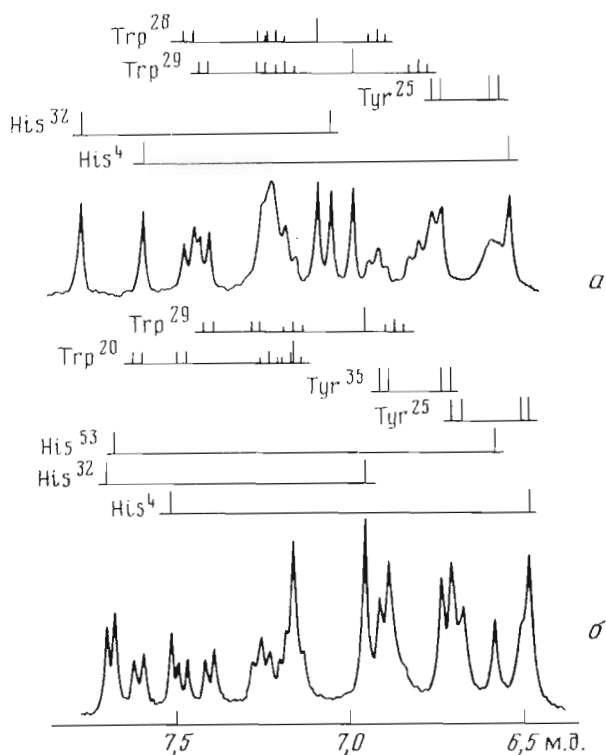


Рис. 2. Ароматическая область спектров ^1H -ЯМР нейротоксина II *N. n. oxiana* (а) и нейротоксина III *N. m. mossambica* (б) в $^2\text{H}_2\text{O}$ (рН 8,1; 41° С)

100 МГц) и изучили рН-зависимости химических сдвигов протонов NH-групп индольного кольца и ряда протонов ароматических СН-групп при рабочей частоте спектрометра 100 МГц в диапазоне значений рН от 2,5 до 8,5 [16]. В данной работе исследованы рН-зависимости химических сдвигов сигналов от всех протонов ароматических СН-групп в более широком диапазоне рН (1–12) при рабочей частоте спектрометра 300 МГц. Результаты согласования рН-зависимостей химических сдвигов сигналов (рис. 3) с теоретическими уравнениями (1) и (2) (см. «Экспериментальную часть») приведены в табл. 1.

Синглетные сигналы (рис. 2) от протонов при С2-атомах имидазольных колец остатков гистидина (His^4 , His^{32} и His^{53}) нейротоксина III выделены в спектрах на основании характерной рН-зависимости их химических сдвигов (рис. 3, табл. 2) и способности к изотопному обмену. Сопоставление рН-зависимостей химических сдвигов этих протонов и других синглетных сигналов в ароматической области спектра (рис. 3, табл. 2) позволяет попарно соотнести сигналы от протонов при С2- и С4-атомах имидазольного кольца. Два оставшихся синглетных сигнала отнесены к протонам при С2-атомах индольных групп двух триптофановых остатков (рис. 2).

Отнесение сигналов от протонов при С2- и С4-атомах имидазольных колец к индивидуальным остаткам в аминокислотной последовательности нейротоксина III получено при сопоставлении скоростей изотопного обмена (в смеси $^2\text{H}_2\text{O}$ и $^3\text{H}_2\text{O}$), измеренных по спектрам ^1H -ЯМР (табл. 3) и степени включения трития в имидазольные кольца отдельных гистидиновых остатков. Отнесение сигналов протонов групп СН остатков гистидина в нейротоксине III описано в работе [21].

Мультиплетные сигналы от спин-связанных ароматических протонов СН-групп остатков Trp^{20} , Trp^{29} и Tyr^{25} , Tyr^{35} соотнесены (табл. 2, рис. 2) с помощью гомоядерного двойного резонанса, аналогично работе [16]. Отнесение сигналов от протонов ароматических колец остатков триптофана

Зависимость химических сдвигов протонов нейротоксина II от pH ($^2\text{H}_2\text{O}$, 32° С)

Амино-кислотный остаток	Наблюдаемый сигнал протонов при атоме	δ^*	$\Delta\delta_1^{2*}$	pK_1	$\Delta\delta_2^{2*}$, м.д.	pK_2	$\Delta\delta_3^{2*}$, м.д.	pK_3	$\Delta\delta_4^{2*}$, м.д.	pK_4
		м.д.								
His ⁴	C2	7,605	4,367	5,12 ^{3*}						
	C4	6,550	0,258	5,05 ^{3*}						
His ³²	C2	7,762	0,949	5,98 ^{3*}						
	C4	7,057	0,366	5,90	-0,027	3,2				
Trp ²⁸	C2	7,111	0,036	11,3						
	C4 (C7)	7,471	0,024	4,8	0,033	10,8				
	C5 (C6)	7,192	*	11,3	*	*				
	C6 (C5)	6,922	-0,027	11,3						
Trp ²⁹	C7 (C4)	7,225	-0,015	4,1	*	*				
	C2	6,994	0,030	3,9	0,051	5,9	0,033	10,5		
	C4 (C7)	7,429	0,030	3,9	0,030	5,9	0,042	10,7		
	C5 (C6)	7,214	-0,111	3,9	*	*	*	*		
	C6 (C5)	6,814	-0,048	4,6	-0,015	9,9	-0,025	10,7		
Tyr ²⁵	C7 (C4)	7,249	0,043	3,9	*	*				
	C2, C6	6,754	~0,240	≥ 11,6						
Ser ³⁰	C3, C5	6,580	~0,300	≥ 11,8	~0,023	~3,9				
	C α	5,438	-0,162	6,0	-0,015	10,2				
Не идентифицированы	C α	6,299	0,027	10,7	0,042	11,8				
	C α	6,263	-0,030	3,8	0,018	6,0	0,060	9,7	-0,051	12
	C α	5,987	0,114	4,1 ^{3*}						
	C α	5,927	0,048	9,0	-0,030	10,6				
	C α	5,690	0,060	9,0	-0,048	10,8				
Thr ³⁵	C α	5,513	-0,018	3,8	-0,071	9,2				
	C1	1,081	0,024	5,9						
Phe ³⁶	C β	0,092	0,112	3,8	0,044	5,9	-0,081	9,8		
	C1'	0,374	-0,095	3,8	0,028	5,9	0,011	9,8		
Phe ³⁷	C δ	0,489	0,040	3,8	0,074	5,9	-0,028	9,8	0,026	10,7
	C1'	0,859								
	C δ	0,641	0,016	5,4						

* Значения химических сдвигов сигналов измерены при pH 8,0.

** Нижние индексы при величинах $\Delta\delta_i$ соответствуют депротонированию i -й ионогенной группы.** Коэффициент Хилла n_H равен 1.

** Величины не поддаются определению вследствие перекрытия сигналов.

и тирозина (Trp²⁰, Trp²⁹, Tyr²⁵ и Tyr³⁰) к индивидуальным аминокислотным остаткам нейротоксина III получено при сравнении спектров ¹H-ЯМР этого токсина и нейротоксина II (рис. 2). Для инвариантного остатка Tyr²⁵ в обоих нейротоксинах константа диссоциации фенольного гидроксила завышена ($pK_a > 12$) относительно нормального значения (pK_a 10,3 [32]). Сильнопольный дублетный сигнал от протонов при C3- и C5-атомах этого остатка уширен при температурах ниже 40° С, что свидетельствует о заторможенном вращении фенольного кольца вокруг связи C β -C1' [33]. На химический сдвиг этого сигнала оказывает влияние титрование карбоксильной группы, имеющей pK_a 3,7-3,9 (табл. 1 и 2). Значение pK_a (9,8) титрования фенольного гидроксила остатка Tyr³⁵ близко к нормальному значению, химические сдвиги протонов его ароматического кольца чувствительны к изменению ионизационного состояния карбоксильной группы (pK_a 2,6) и имидазольного кольца остатка His³² (pK_a 5,8) (рис. 3, табл. 2). Отнесение сигналов протонов остатков тирозина в нейротоксинах II и III к протонам при C2- и C6- или C3- и C5-атомах основано на литературных данных, согласно которым титрование фенольного гидроксила в большей степени влияет на химические сдвиги протонов в положениях 3 и 5 ароматического кольца и в меньшей — на химические сдвиги протонов в положениях 2 и 6 [32] (рис. 3, табл. 1 и 2).

Для инвариантного остатка Trp²⁹ в обоих нейротоксинах химические сдвиги протонов СН- и NH-групп индольного кольца зависят от ионизации

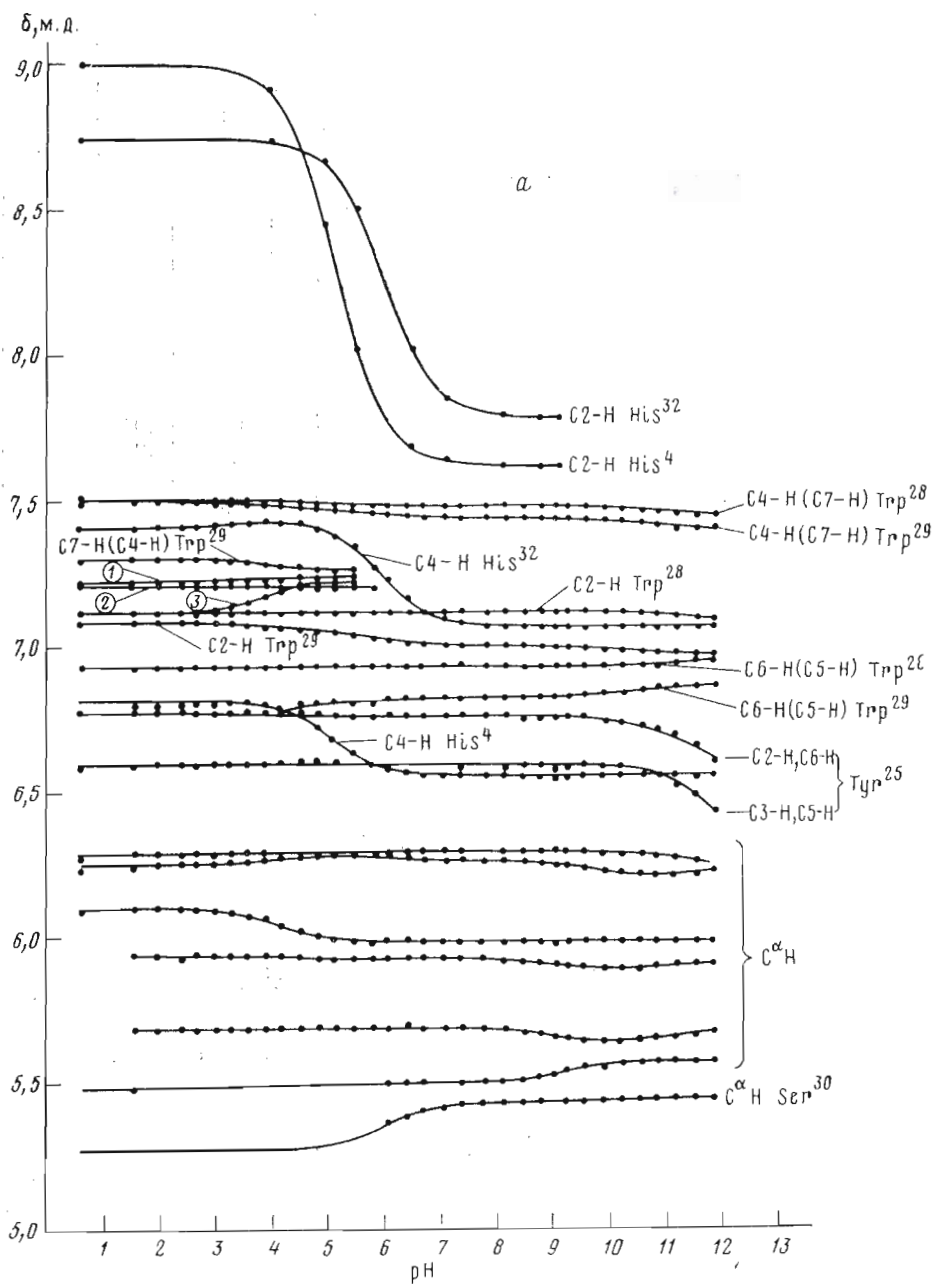


Рис. 3. pH-Зависимости химических сдвигов ароматических и слабокислых $C^{\alpha}H$ -протонов нейротоксина II (а) и ароматических протонов нейротоксина III (б) в 2H_2O при $32^{\circ}C$. pH-Зависимость химических сдвигов протонов индольных колец NH-групп остатков триптофана в нейротоксине III определена в H_2O при $32^{\circ}C$. На рис. а цифрами обозначены: 1 - C7-H (C4-H) остатка Trp^{28} , 2 - C5-H (C6-H) остатка Trp^{28} , 3 - C5-H (C6-H) остатка Trp^{29} , а на рис. б цифрой 1 обозначен C2-H остатка Trp^{29} .

оного состояния двух карбоксильных групп, имидазольного кольца остатка His^{32} и аминогрупп (табл. 1 и 2). Скорость водородного обмена с растворителем (H_2O) его группы NH индольного кольца заметно ниже, чем для групп NH остатков Trp^{28} в нейротоксине II [16] и Trp^{29} в нейротоксине III.

На химические сдвиги протонов SH- и NH-групп индольного кольца остатка Trp^{29} (нейротоксин III) оказывает влияние титрование по крайней мере одной карбоксильной группы с pK_a 3,4 (табл. 2).

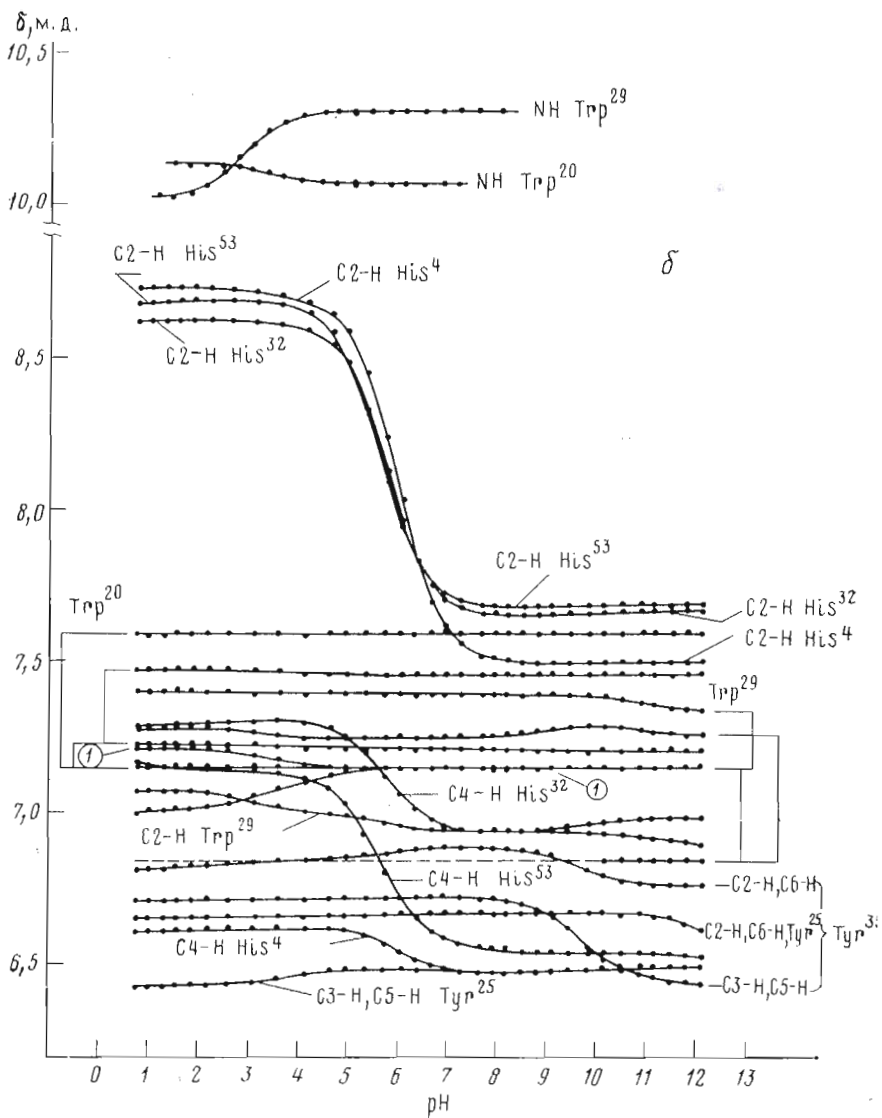


Рис. 36

Область сигналов от протонов CH_3 -групп в спектрах ^1H -ЯМР нейротоксинов II и III приведена на рис. 4. С помощью гомоядерного двойного резонанса и разностной спектроскопии выделены сигналы от всех протонов групп CH_3 и определены химические сдвиги спин-связанных с ними протонов (табл. 4). Используя схему отнесения сигналов в спектрах ^1H -ЯМР [34] и стандартные значения химических сдвигов протонов аминокислотных остатков в белках [35], мы подразделили сигналы от протонов CH_3 -групп на три типа: 1) C^βH_3 аланина и $\text{C}^\gamma\text{H}_3$ треонина; 2) $\text{C}^\gamma\text{H}_3$ валина и $\text{C}^\delta\text{H}_3$ лейцина; 3) C^1H_3 и C^2H_3 изолейцина.

Сигналы от протонов групп C^1H_3 и C^2H_3 остатков изолейцина в ^1H -ЯМР-спектрах нейротоксина II были попарно соотнесены при сравнении pH-зависимостей химических сдвигов сигналов (рис. 5, табл. 1). Отнесение сигналов от протонов метильных групп изолейциновых остатков нейротоксина II к положению в аминокислотной последовательности основано на сравнении ^1H -ЯМР-спектров нейротоксинов II и III. В высокопольной области спектров этих токсинов при 0,092 м.д. (в нейротоксине II, pH 8,0) и при 0,122 м.д. (в нейротоксине III, pH 8,0) расположен широкий сигнал интенсивностью в одну протонную единицу, обладающий весьма характерной и подобной для обоих токсинов зависимостью химического сдвига от pH среды (рис. 4, 5). Аналогичный сигнал имеется

Зависимость химических сдвигов протонов нейротоксина III от pH ($^2\text{H}_2\text{O}$, 32°C)

Амино-кислотный остаток	Наблюдаемый сигнал протонов при атоме	δ^*	$\Delta\delta_1^{**}$	ρK_1	n_{H}	$\Delta\delta_2^{**}$	ρK_2	$\Delta\delta_3^{**}$	ρK_3	$\Delta\delta_4^{**}$	ρK_4
		м.д.				м.д.		м.д.		м.д.	
His ⁴	C2	8,717	1,219	5,96	0,96						
	C4	6,616	0,149	6,01	1,0	-0,02	9,6	-0,01	10,6		
His ³²	C2	8,618	0,973	5,78	1,0						
	C4	7,282	0,370	5,78	1,0	-0,02	~2,6				
His ⁵³	C2	8,663	0,987	5,61	0,98	-0,01	~1,3				
	C4	7,151	0,594	5,64	0,97	0,02	~1,3				
Trp ²⁰	N1	10,181	0,067	3,35							
	C2	7,208	0,064	3,44							
	C4 (C7)	7,587									
	C5 (C6)	7,146									
	C6 (C5)	7,225	0,02	3,8±0,3							
Trp ²⁹	C7 (C4)	7,471	0,02	3,6±0,3							
	N1	10,058	-0,290	2,7							
	C2	7,070	0,074	3,1		0,06	5,7				
	C4 (C7)	7,386	0,05	~10,6							
	C5 (C6)	7,003	-0,136	3,5							
	C6 (C5)	6,841	?	?							
Tyr ²⁵	C7 (C4)	7,280	0,03	3,1		-0,05	~9,6	0,05	~10,6		
	C2, C6	6,656	≥0,1	≥12							
	C3, C5	6,426	?	?		-0,05	3,7				
Tyr ³⁵	C2, C6	6,815	0,130	9,7	1,0	-0,03	~2,6	-0,04	~5,8		
	C3, C5	6,711	0,280	9,75	0,97						
Arg ³⁶	C ^β	0,366	0,18	2,53		0,07	5,9	-0,27	9,6	0,30	10,6

* Значения химических сдвигов протонов измерены при pH 2,2.

** Нижние индексы при величинах $\Delta\delta_i$ соответствуют депротонированию i -й ионизационной группы.

Таблица 3

Константы скорости дейтерообмена k_b , $\text{с}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$, протонов при C2-атомах и ρK_α (в скобках) имидазольных колец остатков гистидина *

Соединение	His ⁴	His ³²	His ⁵³
Нейротоксин II <i>N. n. oxiana</i> [16]	2653 (5,02)	36 (5,93)	—
Нейротоксин III <i>N. m. mossambica</i> [31]	248 (5,96)	125 (5,76)	302 (5,61)
Кобротоксин <i>N. n. atra</i> [21]	1730 (5,11)	146 (5,72)	—
Метиламид N-ацетил-L-гистидина [21]		58 (6,42)	

* Значения k_b рассчитывались по уравнению, приведенному в работе [30]:
$$k_{\text{набл}} = k_b K_W / (K_\alpha + [\text{H}_3\text{O}^+]),$$

где $k_{\text{набл}}$ — кажущаяся (наблюдаемая) константа скорости изотопного обмена протона при C2-атоме имидазольного кольца на дейтерий; K_W — ионное произведение воды (при 30°C $K_W = 10^{-13,833}$, а при 40°C $K_W = 10^{-13,5318}$); $K_\alpha = [\text{His}]^+ / [\text{His}]$ — константа ионизации имидазольного кольца.

в спектре ^1H -ЯМР нейротоксина I *N. m. mossambica* [18]. В нейротоксине II этот сигнал отнесен к протону C^βH-группы одного из изолейциновых остатков (He³⁶ или He³⁷). Сигнал от спин-связанного с ним C^α-протона расположен при 3,99 м.д. (табл. 4). В нейротоксине III высокопольный широкий сигнал также принадлежит протону при C^β-атоме, связанному спин-спиновым взаимодействием с протоном C^αH-группы, сигнал от которого расположен при 3,79 м.д. (табл. 4). Приведенные выше данные свидетельствуют о подобии пространственного окружения этих протонов C^βH-групп и с учетом гомологии пространственного строения нейротоксинов указывают на их принадлежность к остаткам, занимающим одинаковое положение в аминокислотной последовательности (36 или 37). Так как в нейротоксине III (где 36-й и 37-й аминокислотные остатки представляют собой аргинин и треонин соответственно) этот протон при C^β-атоме не связан спин-спиновым взаимодействием с протонами CН₃-группы (рис. 4), его следует отнести к остатку Arg³⁶ и, следовательно,

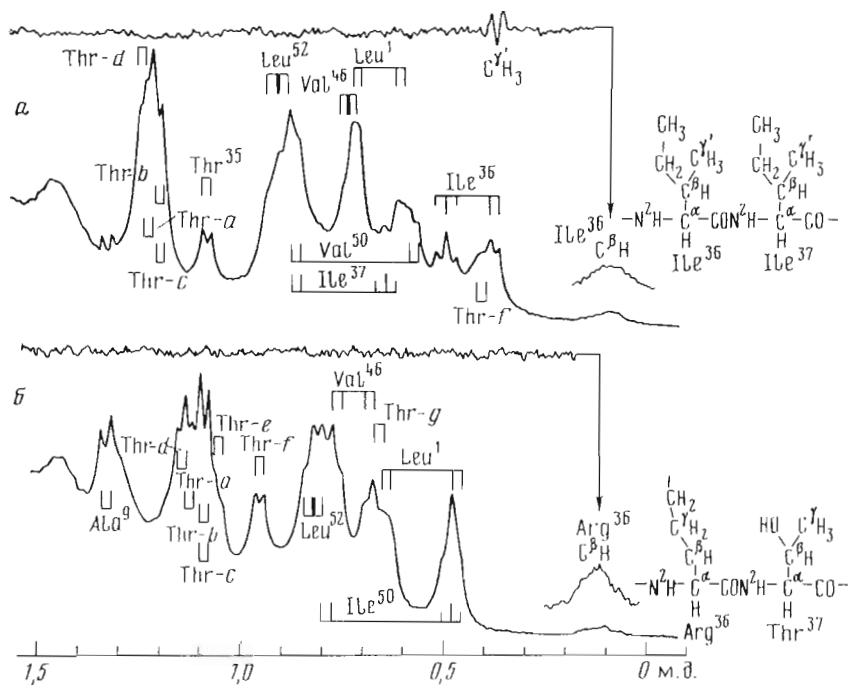


Рис. 4. Область сигналов от протонов CH_3 -групп нейротоксина II (а) и нейротоксина III (б) в $^2\text{H}_2\text{O}$ (рН 8,0; 32°C). Там же приведены разностные спектры, полученные при вычитании спектров без облучения и с облучением радиочастотным полем, соответствующим сигналу при $\sim 0,1$ м.д. Отнесение сигналов от метильных протонов остатков валина, лейцина и аланина взято из работ [29, 31]

в спектре ^1H -ЯМР нейротоксина II сигнал при 0,092 м.д. принадлежит протону C^βH -группы Ile^{36} . Сдвиг сигнала протона при C^β -атоме 36-го остатка в сильное поле по сравнению со стандартным положением, найденным в конформационно лабильных пептидах [35], может быть объяснен лишь эффектом π -кольцевого тока от пространственно сближенного ароматического аминокислотного остатка. Действительно, при облучении радиочастотным полем, соответствующим резонансу протонов CH_3 -группы остатка Ile^{36} в нейротоксине II, мы наблюдали отрицательный эффект Оверхаузера на сигналах от индольных протонов остатка Trp^{29} .

II. Производные нейротоксина II

При исследовании пространственного строения пептидов и белков широко применяются сдвиговые и уширяющие реагенты (обычно это ионы металлов, чаще всего лантаноидов). Популярность сдвиговых и уширяющих реагентов связана с тем, что анализ вызванных ими возмущений позволяет определять пространственное строение молекулы в области связывания иона. Очевидно, этот метод имеет свои ограничения: для успешного применения парамагнитных катионов металлов необходимо, чтобы молекула имела специфическое место связывания ионов; кроме того, эти реагенты могут быть применены в сравнительно узком диапазоне значений рН.

С целью преодоления этих затруднений при исследовании топографии нейротоксина II были применены ковалентно связываемые с молекулой токсина тринитрофенильная и спиновые метки, селективно введенные по ϵ -аминогруппам остатков лизина. Тринитрофенильная метка, обладающая благодаря π -кольцевому току диамагнитной анизотропией, должна приводить к изменению химических сдвигов протонов, расположенных в пространственной близости от нее. Неспаренный электрон спиновых меток вызывает в спектрах ^1H -ЯМР уширение сигналов протонов, расположенных вблизи от иминоксильного радикала.

Химические сдвиги протонов СН₃-группи (²H₂O, pH 8,0; 32° С) и спин-связанных с ними протонов в спектрах ¹H-ЯМР нейротоксинов II и III

Отнесение сигналов от протонов остатков валлина, лейцина и аланина взято из работ [29, 31]

Нейротоксин II				Нейротоксин III		
Амино-кислотный остаток	δ, м.д. СН ₃	δ, м.д. $\underline{\text{CH}}-\text{CH}_3^*$	δ, м.д.	Амино-кислотный остаток	δ, м.д. СН ₃	δ, м.д. $\underline{\text{CH}}-\text{CH}_3^{**}$
Thr-a	1,227	4,48		Ala ⁹	1,341	4,60
Thr-b	1,197	4,42		Thr-a	1,144	4,44
Thr-c	1,197	4,30		Thr-b	1,097	4,70
Thr-d	1,235	4,02		Thr-c	1,101	4,37
Thr ³⁵	1,081	3,86		Thr-d	1,161	3,88
Thr-f	0,412	3,7-3,8		Thr-e	1,064	3,67
Val ⁴⁶	0,719	2,08		Thr-f	0,967	3,71
	0,739	2,08		Thr-g	0,657	3,66
Val ⁵⁰	0,573	2,04		Val ⁴⁶	0,696	2,04
	0,863	2,04			0,774	2,04
Leu ⁵²	0,893	1,47		Leu ⁵²	0,821	1,42
	0,925	1,47			0,841	1,42
Leu ¹	0,605	1,40		Leu ¹	0,473	1,32
	0,709	1,40			0,636	1,32
Ис ³⁶	0,374 (C ^γ H ₃)	0,15	3,99 (C ^α H)	Ис ⁵⁰	0,791 (C ^γ H ₃)	1,97
	0,489 (C ^δ H ₃)	0,95			0,477 (C ^δ H ₃)	1,34
		0,78				1,00
Ис ³⁷	0,859 (C ^γ H ₃)	1,41		Arg ³⁶	0,122 (C ^β H)	3,79 (C ^α H) ^{3*}
	0,641 (C ^δ H ₃)	~1,5				

* Значения химических сдвигов определены при pH 8,0 и 55° С.

** Значения химических сдвигов определены при 2,2 и 32° С.

*** Химический сдвиг измерен при pH 8,2 и 32° С.

Таблица 5

Химические сдвиги ароматических протонов нейротоксина II и их изменения при введении тринитрофенильной метки по ε-аминогруппе Lys²⁷ (²H₂O, pH 8,0; 50° С)

Амино-кислотный остаток	Наблюдаемый сигнал протонов при атоме	δ	Δδ	Амино-кислотный остаток	Наблюдаемый сигнал протонов при атоме	δ	Δδ
		м.д.				м.д.	
His ⁴	C2	7,596	-0,003	His ³²	C2	7,776	0,006
	C4	6,530	0,005		C4	7,041	-0,001
Trp ²⁸	C2	7,081	0,002	Trp ²⁹	C2	6,989	-0,226
	C4(C7)	7,462	-0,041		C4(C7)	7,412	-0,143
	C5(C6)	7,177	-0,021		C5(C6)	7,210	-0,168
	C6(C5)	6,910	-0,034		C6(C5)	6,810	-0,077
	C7(C4)	7,245	0,261		C7(C4)	7,249	-0,026
Tyr ²⁵	C2, C6	6,750	-0,084				
	C5, C5	6,590	-0,070				

Тринитрофенильная метка на ε-аминогруппе остатка Lys²⁷ вызывает значительные изменения химических сдвигов ряда протонов ароматических колец нейротоксина II (рис. 6). Эти изменения вызваны диамагнитной анизотропией тринитрофенильной метки и локальными структурными изменениями молекулы токсина в районе модификации (об отсутствии тотальных изменений конформации молекулы свидетельствуют данные КД [36]).

Сравнение спектров ¹H-ЯМР нейротоксина II и его тринитрофенильного производного (рис. 6) позволяет легко отпести сигналы от протонов имидазольных колец гистидиновых остатков последнего (их химические сдвиги при модификации не меняются). Сигналы от протонов СН-групп ароматических колец остатков триптофана и тирозина в спектре ¹H-ЯМР тринитрофенильного производного нейротоксина II соотнесены с помощью гомоядерного двойного резонанса. Отнесение сигналов от ароматических протонов остатков триптофана к индивидуальным остаткам в аминокислотной последовательности этого производного нейротоксина II получено

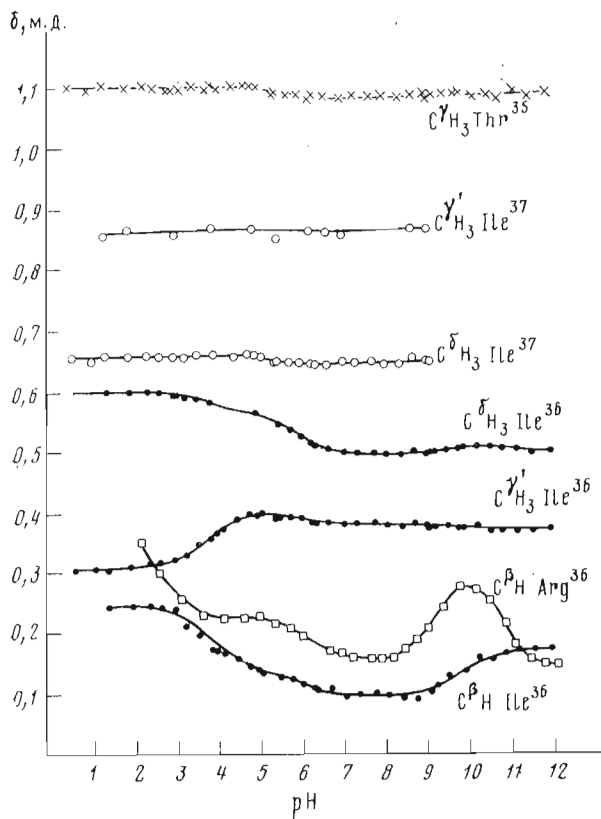


Рис. 5. pH-Зависимость химических сдвигов протонов метильных групп нейротоксина II, входящих в состав центральной петли, а также протонов $C^{\beta}H$ -группы остатка Ile³⁶ нейротоксина II и $C^{\beta}H$ -группы остатка Arg³⁶ нейротоксина III в 2H_2O при 32° С

при сравнении температурных зависимостей химических сдвигов сигналов в нативном и модифицированном нейротоксине II. Повышение температуры, увеличивая подвижность тринитрофенильной группы, уменьшает влияние ее диамагнитной анизотропии на химические сдвиги и тем самым позволяет соотнести сигналы соответствующих триптофановых протонов в нативном токсине и его тринитрофенильном производном (рис. 7, табл. 5). Введение тринитрофенильной группы по ϵ -аминогруппе Lys²⁷ значительно изменяет химические сдвиги протонов остатка Trp²⁹, одного из протонов остатка Trp²⁸ и вызывает небольшие изменения химических сдвигов протонов фенольного кольца Tyr²⁵ (табл. 5). Сопоставление спектров модифицированного и нативного токсинов (рис. 8) также показывает, что введение тринитрофенильной метки по ϵ -аминогруппе Lys²⁷ вызывает смещение сигналов от протонов метильных групп остатка Ile³⁶ и, по-видимому, не влияет на соответствующие сигналы от протонов остатка Ile³⁷.

Моноспин-меченные по ϵ -аминогруппам Lys²⁶ и Lys²⁷ производные нейротоксина II были исследованы методами ЭПР и ЯМР.

Температурная зависимость формы ЭПР-спектров свидетельствует о монотонном характере увеличения частоты вращения спиновых меток по мере повышения температуры с 20 до 55° С (рис. 9) и, следовательно, об отсутствии резких изменений локального окружения спиновых меток в этом диапазоне температур. Рассчитанные из этих данных параметры активации вращательного движения спиновых меток (табл. 6) показывают, что спиновые метки в соответствии с классификацией [37] находятся на поверхности белковой глобулы. Аналогичный вывод был сделан ранее при сравнении подвижности спиновых меток относительно белко-

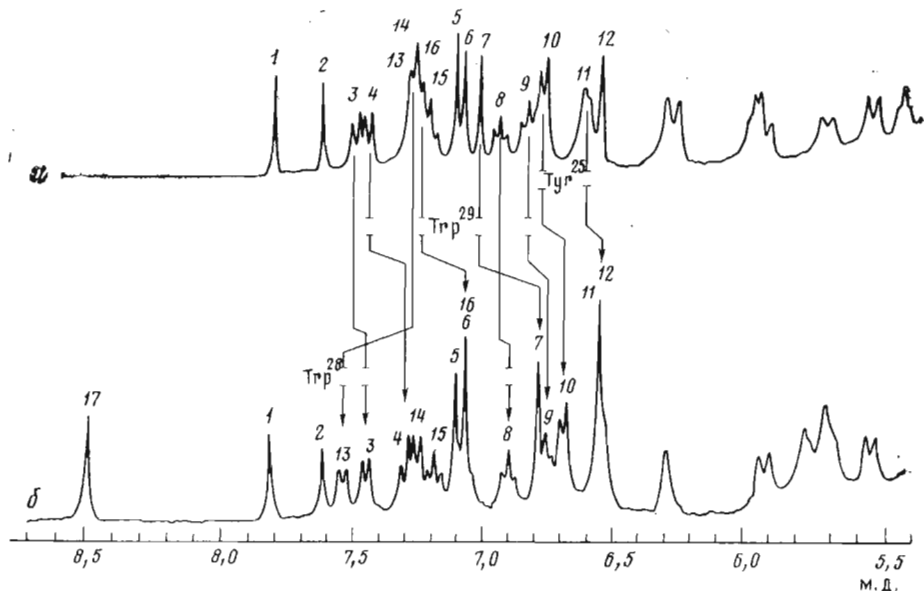


Рис. 6. Область сигналов от ароматических протонов и слабopольных протонов: C^αH-групп нейротоксина II (а) и его производного (б), в котором тринитрофенильная метка введена по ε-аминогруппе остатка Lys²⁷, в ²H₂O (рН 8,0; 50° С). Сигналы от ароматических протонов обозначены номерами: 1 и 6 – С2-Н и С4-Н остатка His³²; 2 и 12 – С2-Н и С4-Н остатка His⁴; 10 и 11 – С2-Н, С6-Н и С3-Н, С5-Н остатка Tyr²⁵ соответственно; 5, 3, 15, 8 и 13 – С2-Н, С4-Н (С7-Н), С5-Н (С6-Н), С6-Н (С5-Н) и С7-Н (С4-Н) остатка Trp²⁸ соответственно; 7, 4, 16, 9 и 14 – С2-Н, С4-Н (С7-Н), С5-Н (С6-Н), С6-Н (С5-Н) и С7-Н (С4-Н) остатка Trp²⁹ соответственно; 17 – сигнал от ароматических протонов тринитрофенильной метки

вой глобулы и скоростей обменной релаксации между спиновыми метками и парамагнитным зондом K₃[Fe(CN)₆] [28].

Введение стабильных иминоксильных радикалов по ε-аминогруппам остатков Lys²⁶ или Lys²⁷ вызывает значительное уширение отдельных сигналов в спектрах ¹H-ЯМР нейротоксина II. Для некоторых сигналов наблюдается также изменение химического сдвига (рис. 10 и 11), которое более четко проявляется при восстановлении иминоксильного радикала спин-меченных производных нейротоксина II в кислой среде (рис. 10) или аскорбиновой кислотой (рис. 12). При этом снимаются индуцированные неспаренным электроном парамагнитные вклады во времена релаксации ядер, что приводит к сужению сигналов в спектрах ¹H-ЯМР этих соединений.

Отнесение сигналов в спектрах ¹H-ЯМР спин-меченных производных нейротоксина II и производных нейротоксина II с восстановленными спиновыми метками получено при сравнении мультиплетности и химических сдвигов сигналов, а также результатов экспериментов по гомоядерному двойному резонансу для этих соединений с аналогичными данными для нативного нейротоксина II. Для отнесения сравнивали также рН-зависимости химических сдвигов сигналов в спектрах этих производных нейротоксина II (исследования при рН 4–8) и в нативном токсине, которые оказались подобны в этом диапазоне рН среды.

Как правило, сигналы, изменяющие значение химического сдвига при модификации, значительно уширены неспаренным электроном спиновых меток (например, сигнал протона при атоме С6 (или С5) остатка Trp²⁹ и сигнал протона C^αH-группы при 6,09 м.д. в [Lys²⁷(SL)] нейротоксине II, рис. 10). Очевидно, соответствующие протоны должны находиться в пространственной близости от места модификации, а изменения химических сдвигов вызваны удалением положительного заряда с ε-аминогруппы лизинового остатка и локальными конформационными возмущениями в районе модификации. Исключение наблюдается лишь для сигнала от протона при С4-атоме остатка His⁴ при введении спиновой метки по ε-аминогруппе

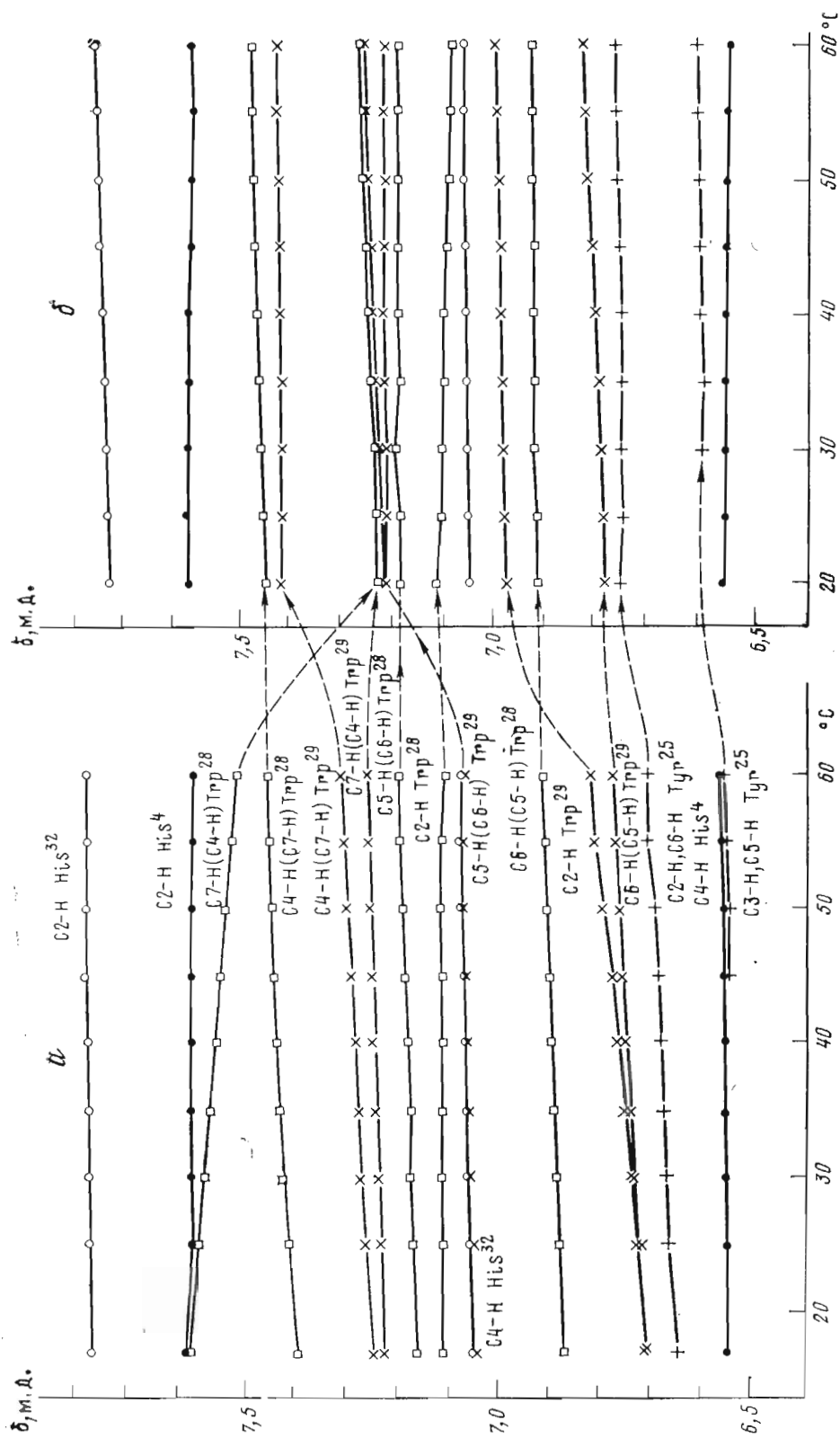


Рис. 7. Температурные зависимости химических сдвигов ароматических протонов нейротоксина II (δ) и его тринитрофенилированного по ϵ -аминогруппе остатка Lys²⁷ производного (α) в $^2\text{H}_2\text{O}$, pH 8,0

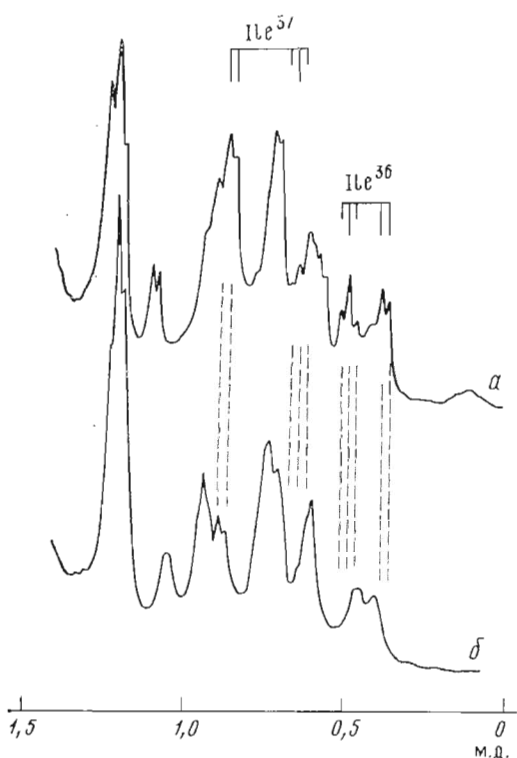


Рис. 8

Рис. 8. Область сигналов от протонов CH_3 -групп нейротоксина II (а) и его тринитрофенилированного по ϵ -аминогруппе остатка Lys^{27} производного (б). Пунктирными линиями показано положение сигналов от протонов CH_3 -групп остатков изолейцина в нативном токсине ($^2\text{H}_2\text{O}$, pH 8,0; 40°C)

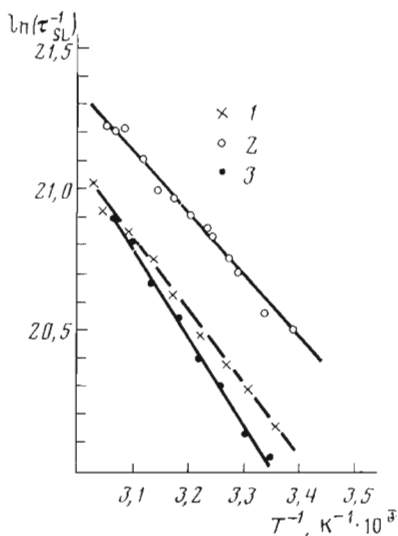
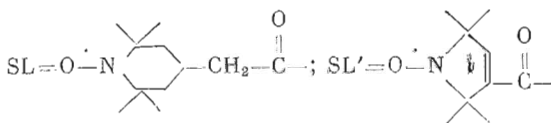


Рис. 9

Рис. 9. Температурная зависимость подвижности спиновых меток на ϵ -аминогруппах остатков лизина [$\text{Lys}^{26}(\text{SL})$]- (1), [$\text{Lys}^{27}(\text{SL}')$]- (2) и [$\text{Lys}^{27}(\text{SL})$]- (3) производных нейротоксина II ($^2\text{H}_2\text{O}$, pH 8,0)



пе остатка Lys^{26} (рис. 11). В этом случае происходит разделение этого сигнала на два сигнала с приблизительно одинаковыми площадями, имеющими разную зависимость ширины от температуры. Вероятно, модификация ϵ -аминогруппы остатка Lys^{26} нейротоксина II приводит к появлению в растворе конформационного равновесия с медленным в шкале времени метода ЯМР обменом между конформерами. Хотя отсутствие значительного уширения сигналов протонов при C4-атоме остатка His^4 свидетельствует об относительной удаленности имидазольного кольца остатка His^4 от спиновой метки, существование конформационного равновесия в растворе спин-меченного производного проявляется лишь в поведении сигналов от протона при C4-атоме остатка His^4 и протонов ароматических CH -групп остатка Trp^{28} (75% сигналов протонов остатка Trp^{28} очень сильно уширены неспаренным электроном спиновой метки, тогда как 25% почти не уширены). В поведении же остальных сигналов, выделенных в спектре ^1H -ЯМР этого соединения, существование конформационного равновесия не проявляется. Следовательно, различия в пространственном строении конформеров носят ограниченный характер и, по-видимому, локализованы в районе расположения боковых цепей остатков His^4 , Lys^{26} и Trp^{28} .

Для определения парамагнитных вкладов во времена релаксации протонов ароматических колец и слабopольных протонов C^αH -групп прове-

Времена корреляции, τ_{SL} , спиновых меток при 50° С и активационные параметры движения спиновых меток в моноспин-меченных производных нейротоксина II в $^2\text{H}_2\text{O}$

Производное нейротоксина II	pH	$\tau_{SL} \cdot 10^{10}$, с	ΔH^{\ddagger} , ккал·моль ⁻¹	$\frac{\Delta S^{\ddagger}}{R}$, кал·моль ⁻¹ ·К ⁻¹
[Lys ²⁶ (SL)]-	8,0	9,02	5,1	-1,6
[Lys ²⁷ (SL)]-	8,0	6,75	4,4	-3,2
[Lys ²⁷ (SL)]-	8,0	9,41	6,1	1,5
[Lys ²⁷ (SL)]-	4,0	8,13	6,1	1,6

дено моделирование спектров ^1H -ЯМР нейротоксина II и его спин-меченных производных.

Для [Lys²⁷(SL)]нейротоксина II с восстановленной спиновой меткой также проведено моделирование области спектра, в которой расположены сигналы от протонов СН-групп ароматических колец. Для сильно уширенных иминоксильным радикалом сигналов предполагалось, что их полуширина составляет 80 Гц, при такой полуширине сигналы не удается наблюдать в спектре.

Поскольку ширина сигналов в нативном нейротоксине II и в его производных с восстановленными спиновыми метками оказалась примерно одинаковой, разности между шириной сигналов в спектрах ^1H -ЯМР спин-меченных производных нейротоксина II и нативного токсина использовались для расчетов расстояний между иминоксильными радикалами и соответствующими протонами.

Сигналы от протонов метильных групп спин-меченных производных нейротоксина II в зависимости от степени уширения неспаренным электроном спиновых меток были подразделены на три типа: 1) практически не уширяющиеся (уширены менее чем на 4 Гц); 2) уширенные; 3) сильно уширенные (уширенные свыше 30–40 Гц).

На рис. 13 приведены теоретические (расчитанные по уравнению (12)) зависимости уширения сигналов протонов в спектрах ^1H -ЯМР от расстояния между протоном и иминоксильным радикалом для спин-меченных производных нейротоксина II при 50 и 32° С. Расчеты проведены по теории Соломоша — Бломбергена [38], в качестве времени корреляции диполь-дипольного взаимодействия использовали времена корреляции спиновых меток, определенные из спектров ЭПР (более подробно см. «Экспериментальную часть»). Вследствие близких значений времен корреляции спиновых меток на ϵ -аминогруппах остатков Lys²⁶ и Lys²⁷ эффективность уширения сигналов спиновыми метками примерно одинакова. Понижение температуры приводит к увеличению времен корреляции спиновых меток (рис. 13) и вследствие этого к увеличению уширения сигналов, что действительно наблюдается в спектрах ^1H -ЯМР спин-меченных производных нейротоксина II.

Анализ теоретических зависимостей уширения сигналов (рис. 13) показывает, что исследование спин-меченных производных нейротоксина II (при 50 и 32° С) позволяет определять расстояния между неспаренным электроном и протонами в интервале 8,5–13 Å. При расстояниях менее 8,5 Å уширение сигналов иминоксильными радикалами превышает 40 Гц, что значительно осложняет регистрацию сигналов этих протонов в спектрах. Для этих протонов оценен верхний предел возможных расстояний до иминоксильного радикала. При расстояниях выше 13 Å внутримолекулярные парамагнитные вклады становятся сопоставимыми с вклады от других механизмов, в число которых входят и межмолекулярные парамагнитные вклады, что значительно понижает точность оценки расстояний до иминоксильного радикала. Поэтому для сигналов от протонов, уширенных иминоксильным радикалом менее чем на 4 Гц, был оценен лишь нижний предел возможных расстояний до иминоксильного радикала (12–13 Å). Из расчетов следует, что изменение расстояния между иминоксильными радикалами и протонами, удаленными от групп с не-

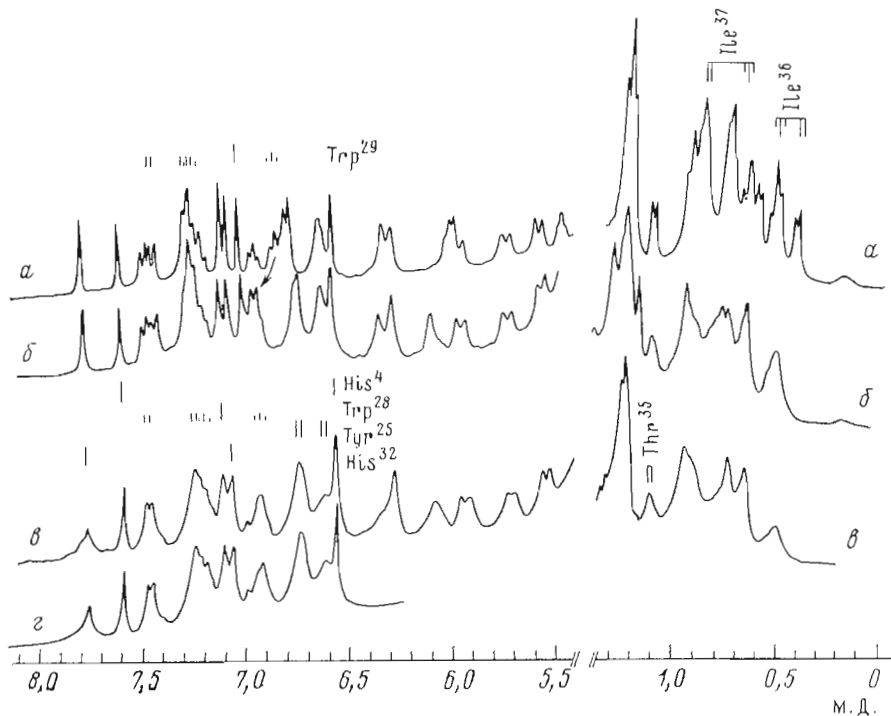


Рис. 10. Фрагменты спектров ^1H -ЯМР ($^2\text{H}_2\text{O}$, pH 8,0; 50°C) нейротоксина II (а) и его производных по ϵ -аминогруппе остатка Lys 27 : спин-меченного (б) и производного с «погашенной» меткой (в). «Гашение» метки проведено в $^2\text{H}_2\text{O}$ (pH 3,9; 50°C) в течение 20 ч. Спиновая метка типа SL. Теоретический спектр (г) от ароматических протонов спин-меченного производного построен в предположении, что спиновая метка «погашена» в 10% молекулу

спаренным электроном на 9–13 Å, приведет к значительным и легко детектируемым изменениям ширины сигналов соответствующих протонов. Для производного нейротоксина II со спиновой меткой на ϵ -аминогруппе остатка Lys 27 было обнаружено, что ширина сигналов от протонов при C2- и C4-атомах остатка His 32 зависит от pH среды. При уменьшении pH от 8 до 4, сопровождающемся приобретением имидазольным кольцом остатка His 32 положительного заряда (pK_a 5,9), происходит сужение сигналов от указанных протонов этого остатка (рис. 14). При этом, однако, сигналы остальных протонов, выделенные в спектрах ^1H -ЯМР этого спин-меченного производного (протонов ароматических ядер, протонов CH_3 -групп и т. д.), в пределах погрешности эксперимента не меняют своей ширины. Согласно данным ЭПР, время корреляции спиновой метки почти не меняется (табл. 6). Таким образом, изменение ионизационного состояния остатка His 32 сопровождается локальным изменением конформации этого аминокислотного остатка.

Возможны два крайних варианта: изменение конформации боковой цепи (углы χ_1 и χ_2) остатка His 32 или локальное изменение конформации основной цепи в районе 32-го аминокислотного остатка. Имеющиеся экспериментальные данные не позволяют сделать выбор одной из альтернатив. Можно только сказать, что в процессе этого конформационного перехода имидазольное кольцо остатка His 32 приобретает положительный заряд и удаляется от спиновой метки на ϵ -аминогруппе остатка Lys 27 .

III. Пространственное строение центральной петли нейротоксина II

При построении модели пространственного строения центральной петли нейротоксина II (участка молекулы между 24-м — 41-м аминокислотными остатками) мы использовали данные спектроскопии ЯМР о микроокружении индивидуальных аминокислотных остатков в нейроток-

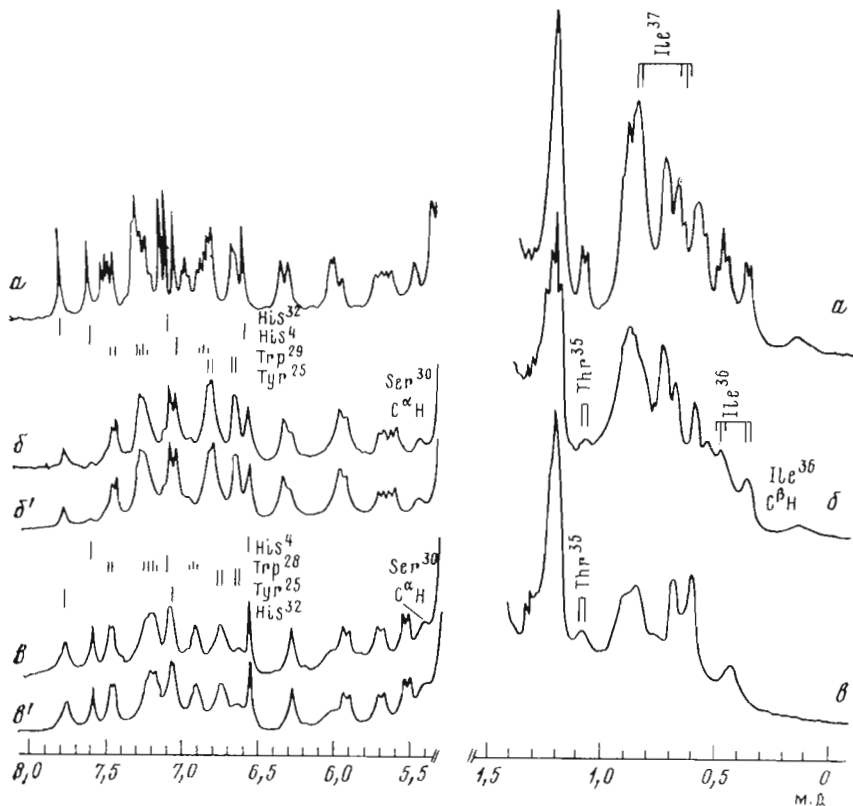


Рис. 11. Фрагменты спектров ^1H -ЯМР нейротоксина II (а), $[\text{Lys}^{26}(\text{SL})]$ нейротоксина II (б) и $[\text{Lys}^{27}(\text{SL}')]$ нейротоксина II (в) в $^2\text{H}_2\text{O}$ при 50°C . Спектры а и б записаны при pH 8,7, спектр в – при pH 8,0. Теоретические спектры этих производных – б' и в' соответственно

сине II, гомологичных нейротоксинах и химически модифицированных производных нейротоксина II. Корректность такого подхода основана на следующих фактах:

1) «короткие» пептиды в растворе имеют сходное пространственное строение. Об этом свидетельствуют полученные ранее спектроскопические данные, а также результаты настоящей работы, обнаружившие значительное сходство в микроокружении эквивалентных по аминокислотной последовательности остатков;

2) химическая модификация ϵ -аминогрупп остатков Lys^{26} и/или Lys^{27} не приводит к существенным искажениям пространственной структуры нейротоксина II. О сохранении структуры молекулы при модификации свидетельствуют данные КД [36] и ЯМР. Например, модификация не затрагивает химические сдвиги сигналов, чье аномальное положение в спектре ^1H -ЯМР нейротоксина II связано со спецификой пространственного строения молекулы (смещенные в необычно слабое поле сигналы от протонов C^αH -групп и сдвинутые в сильное поле сигналы от протона C^βH -группы остатка Phe^{36} и протонов CH_3 -групп). Кроме того, при модификации практически не изменяется влияние pH на химические сдвиги сигналов и сохраняется температурная зависимость ширины сигналов ароматических протонов остатка Tyr^{25} . Небольшие изменения пространственной структуры нейротоксина II, замеченные при введении спиновой метки на ϵ -аминогруппу остатка Lys^{26} , как уже отмечалось выше, носят локальный характер.

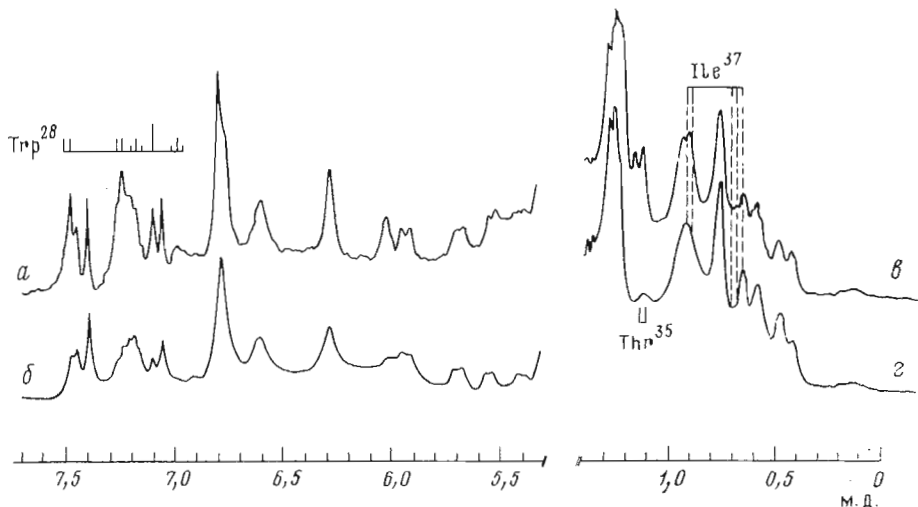


Рис. 12. Восстановление спиновой метки (типа SL) на ϵ -аминогруппе остатка Lys^{26} аскорбиновой кислотой. б, з — спектры ^1H -ЯМР спин-меченного производного; а, в — спектры, полученные после добавления аскорбиновой кислоты. Соотношение концентраций [аскорбиновая к-та]/[токсин]=16. Спектры сняты в $^2\text{H}_2\text{O}$ при 32°C и pH 3,9 (а, б) и при pH 5,8 (в, з)

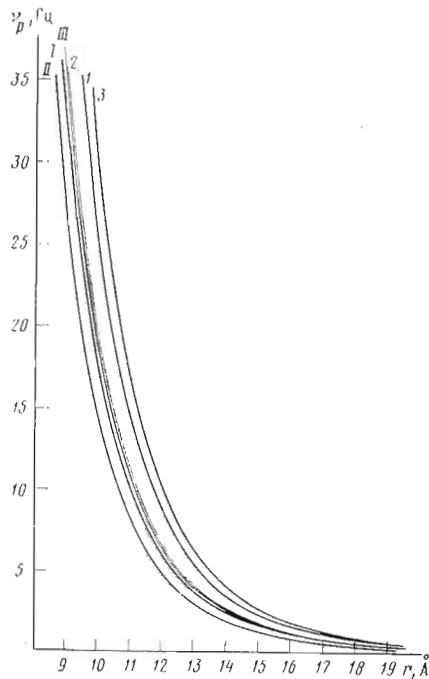
При построении модели пространственной структуры центральной петли нейротоксина II были приняты во внимание прежде всего данные, полученные при изучении моноспин-меченных производных нейротоксина II, а также результаты исследования ядерного эффекта Оверхаузера (ЯОЭ) в нейротоксине II и гомологичных токсинах [22]. Данные, полученные из анализа pH-зависимостей сигналов в спектрах ЯМР, при построении модели рассматривались как вспомогательные, поскольку они неоднозначно связаны с взаимным расположением аминокислотных остатков.

На рис. 15 показаны аминокислотные остатки, входящие в состав центральной петли нейротоксина II, и расстояния между протонами этих аминокислотных остатков и иминоксильными радикалами на ϵ -аминогруппах остатков Lys^{26} или Lys^{27} . Кроме того, на рис. 15 приведено расстояние между иминоксильными радикалами на ϵ -аминогруппах остатков Lys^{26} и Lys^{27} , установленное с помощью спектроскопии ЭПР [29, 39], а также расстояния между протонами, выявленные при исследовании ЯОЭ в нейротоксине II и гомологичных токсинах. Согласно работе [40], ЯОЭ удается регистрировать между протонами, находящимися на расстояниях не более 5 Å.

Согласно табл. 7, спиновые метки пирролинового или пиперидинового ряда, введенные по ϵ -аминогруппе остатка Lys^{27} , имеют сходное локальное окружение, тогда как спиновая метка на Lys^{26} , соседнем с Lys^{27} остатке, попадает в совершенно другое окружение. При анализе взаимного расположения боковых цепей аминокислотных остатков (рис. 15) обращает на себя внимание относительная удаленность боковых цепей соседних по последовательности аминокислотных остатков, тогда как боковые цепи аминокислотных остатков, расположенных в первичной структуре через один остаток, сближены. Такое расположение боковых цепей, как и значение торсионного угла $\varphi = -120^\circ$ для остатка Ser^{30} [41], характерно для антипараллельной β -структуры белка. Этот вывод согласуется с результатами рентгеноструктурного анализа гомологичного белка эрабутоксина *b* *L. semifasciata* [23, 26].

На модели антипараллельной β -структуры центральной петли нейротоксина II мы расположили β -изгиб на аминокислотных остатках 31–34, поскольку между протонами C^αH -группы остатка Ser^{30} и C^βH_2 -группы остатка Thr^{35} (отнесение сигнала протонов C^βH_2 -группы остатка Thr^{35} см. ниже) наблюдается ЯОЭ. При таком расположении β -изгиба боковые цепи

Рис. 13. Теоретические зависимости уширения сигналов протонов (ν_p), индуцированные неспаренным электроном спиновых меток, от расстояния (r) между электронным и ядерным спинами (рассчитаны по данным табл. 6 и уравнению (12)) в $^2\text{H}_2\text{O}$, pH 8,0. I и I' — для $[\text{Lys}^{26}(\text{SL})]$ -нейротоксина II; 2 и II', 3 и III' — для $[\text{Lys}^{27}(\text{SL}')]$ - и $[\text{Lys}^{27}(\text{SL})]$ -производных нейротоксина II соответственно. Арабскими цифрами обозначены зависимости для 32°C , римскими — для 50°C



остатков Trp^{29} и Phe^{36} оказываются тоже сближенными (между протонами боковых цепей этих аминокислотных остатков наблюдается ЯОЭ) и протон C^βH -группы остатка Phe^{36} находится над плоскостью ароматического кольца Trp^{29} , π -кольцевые токи которого смещают сигнал этого протона в аномально высокое поле. Далее варьировалось положение боковых цепей аминокислотных остатков, чтобы, сохраняя антипараллельную β -структуру основной цепи и положение β -изгиба, привести модель в соответствие с результатами оценки расстояний для спин-меченных производных нейротоксина II (рис. 15, табл. 7). Отсутствие стерических затруднений в расположении боковых цепей аминокислотных остатков в соответствии с экспериментальными данными, несомненно, свидетельствует о правильности предлагаемой нами модели (рис. 16).

В рамках предложенной модели можно отнести сигнал при 1,081 м.д. к протонам C^βH_2 -группы остатка Thr^{35} . Согласно модели (рис. 16), эти протоны расположены на расстоянии 10–12 Å от спиновых меток на остатке Lys^{27} и не далее чем 10 Å от спиновой метки на остатке Lys^{26} . Примерно на таком же расстоянии от спиновых меток находятся протоны C^βH_2 -группы одного из остатков треонина (сигнал при 1,081 м.д., рис. 10 и 11, табл. 7), тогда как протоны C^βH_2 -групп остальных остатков треонина удалены от спиновых меток на расстояния, превышающие 12 Å (табл. 7).

Пространственная модель (рис. 16) позволяет объяснить pH-зависимости химических сдвигов сигналов протонов, входящих в состав центральной петли нейротоксинов II, III (рис. 3 и 5, табл. 1 и 2) и других гомологичных нейротоксинов [16–22]. После приведения конформации боковых цепей аминокислотных остатков, входящих в состав центральной петли в соответствие с экспериментальными данными (рис. 15, табл. 7), фенольное кольцо инвариантного остатка Tyr^{25} оказывается направленным в сторону боковой цепи остатка Glu^{38} , находясь на расстоянии, допускающем образование водородной связи между фенольным гидроксилем и карбоксильной группой. Химические сдвиги сигналов протонов ароматического кольца остатка Tyr^{25} в нейротоксинах II и III испытывают небольшие изменения с точками перегиба при pH 3,7–3,9 (табл. 1 и 2). Аналогичные данные получены для гомологичных токсинов: нейротоксина I *N. m. mosambica* [18] и кобротоксина *N. n. atra* [21]. Образование водородной связи между фенольным гидроксилем остатка Tyr^{25} и сильной протоноакцепторной группой было предложено на основании анализа полос поглощения

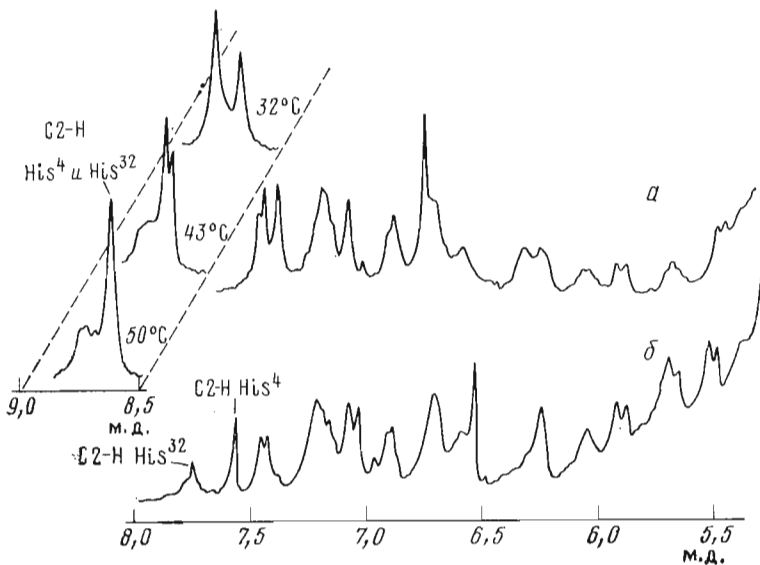


Рис. 14. Влияние pH на ширину сигналов от протонов имидазольного кольца His³² в [Lys²⁷(SL)]нейротоксине II, в ²H₂O при 32° С. а — спектр при pH 4,0, б — при pH 8,0. Слева, внутри штриховых линий, приведены сигналы от медленно обменивающихся на дейтерий протонов NH-групп и от C2-протонов имидазольных колец остатков His⁴ и His³², pH 4,0

этого тирозинового остатка в спектрах комбинационного рассеяния света гомологичных нейротоксинов *L. semifasciata* [42], *Lapemis hardwickii* и *Enhydryna shistosa* [43]. Возможно, что внутримолекулярная водородная связь между остатками Glu³⁸ и Tyr²⁵ обуславливает заторможенное вращение фенольного кольца вокруг связи C^β-C^γ и завышенное значение pK_a > 12 фенольного гидроксила остатка Tyr²⁵ (табл. 1 и 2). Несколько странным, однако, кажется то, что титрование карбоксильной группы остатка Glu³⁸ слабо влияет на химические сдвиги ароматических протонов Tyr²⁵. По-видимому, титрование карбоксильной группы остатка Glu³⁸ сопровождается какими-то процессами, компенсирующими влияние изменения ионизационного состояния карбоксильной группы на химические сдвиги ароматических протонов остатка Tyr²⁵.

Химический сдвиг протона при C4-атоме имидазольного кольца остатка His³² изменяется при титровании карбоксильной группы, имеющей pK_a 3,2 (табл. 1). Из пространственной модели (рис. 16) следует, что эта карбоксильная группа принадлежит остатку Asp³¹.

Боковые цепи остатков Trp²⁹ и Pe³⁶ расположены в пространственной близости от карбоксильных групп остатков Asp³¹ и Glu³⁸, титрование которых вызывает перегибы в pH-зависимостях химических сдвигов протонов Trp²⁹ и Pe³⁶ при значениях pH 3,2–3,9 (рис. 3 и 5, табл. 1). Аналогичным образом объясняются pH-зависимости химических сдвигов протонов остатков Trp²⁹ и Arg³⁶ в нейротоксине III (рис. 3 и 5, табл. 2) и других гомологичных токсинах [18, 20, 21]. Итак, карбоксильная группа остатка Asp³¹ имеет значения pK_a 3,2 и 2,6, а карбоксильная группа остатка Glu³⁸ — 3,9 и 3,7 в нейротоксинах II и III соответственно. Эти значения занижены относительно стандартных значений pK_a 3,9 для β-карбоксильной группы аспарагиновой кислоты и 4,3 для γ-карбоксильной группы глутаминовой кислоты [32]. Причиной этого может быть участие карбоксильных групп в образовании водородной связи или их пространственная сближенность с положительно заряженными группами [44, 45]. Для карбоксильной группы остатка Glu³⁸ заниженное значение pK_a 3,7–3,9 (табл. 1 и 2), по-видимому, в основном обусловлено участием этой группы в образовании внутримолекулярной водородной связи с гидроксилом фенольного кольца остатка Tyr²⁵. Из всех положительными заряженными групп, входящих в состав центральной петли нейротоксина II с карбоксильной группой остатка

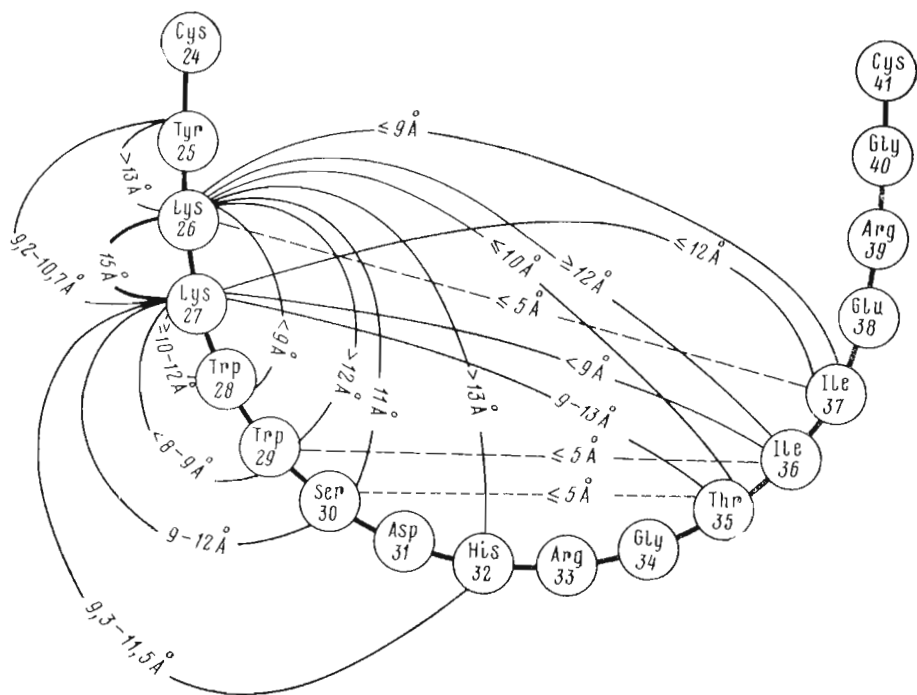


Рис. 15. Аминокислотные остатки, входящие в состав центральной петли нейротоксина II. Приведены расстояния между боковыми цепями аминокислотных остатков в нейротоксине II и его спин-меченных производных (в случае остатка Ser³⁰ указаны расстояния до C^α-протона). Штриховыми линиями соединены аминокислотные остатки, у которых между протонами боковых цепей наблюдали ЯОЭ. ЯОЭ между протонами боковых цепей остатков His²⁶ и Ile³⁷ наблюдали в эрабутоксине b [22]. Тонкими сплошными линиями соединены аминокислотные остатки, расстояние между которыми определено из анализа релаксационных вкладов, индуцированных иминоксильными радикалами. В этом случае приведены расстояния между иминоксильными радикалами (на ε-аминогруппе остатков Lys²⁶ или Lys²⁷) и соответствующим аминокислотным остатком. Толстой сплошной линией соединены остатки Lys²⁶ и Lys²⁷, в этом случае приведено расстояние между иминоксильными радикалами на ε-аминогруппах этих остатков

Asp³¹, могут быть сближены только гуанидиновая группа Arg³³ и имидазольное кольцо остатка His³². Остальные положительно заряженные группы (принадлежащие остаткам Lys²⁶, Lys²⁷ и Arg³⁹), согласно модели (рис. 16), удалены на расстояния, превышающие 10 Å, и не должны [44] влиять на значение pK_a. Более низкое значение pK_a 2,6 карбоксильной группы остатка Asp³¹ в нейротоксине III по сравнению с pK_a 3,2 в нейротоксине II, по-видимому, связано с различиями в аминокислотной последовательности этих токсинов (рис. 1): нейротоксин III содержит в центральной петле две дополнительные положительно заряженные гуанидиновые группы, входящие в состав остатков Arg²⁸ и Arg³⁰. Этим же можно объяснить более низкое значение pK_a имидазольного кольца остатка His³² в нейротоксине III по сравнению с нейротоксином II (табл. 1 и 2).

Согласно модели пространственного строения центральной петли нейротоксина II (рис. 16), рядом с имидазольным кольцом остатка His³² находится карбоксильная группа остатка Asp³¹, отрицательный заряд которой должен приводить к повышению pK_a имидазольного кольца His³² [44]. В действительности же имидазольное кольцо остатка His³² имеет не завышенное, а заниженное значение pK_a. Следовательно, в пространственной близости от имидазольного кольца должна находиться положительно заряженная группа, которая не только компенсирует влияние отрицательного заряда карбоксильной группы, но и занижает значение pK_a имидазольного кольца остатка His³² (pK_a 5,9) по сравнению со стандартным значением pK_a имидазольного кольца гистидина (pK_a 6,4 [46]). Такой положительной

Уширение сигналов протонов в спектрах ^1H -ЯМР спин-меченных производных нейротоксина II, индуцированное неспаренным электроном спиновых меток (ν_p , Гц) и (в скобках) расстояния между иминоксильными радикалами и соответствующими протонами (r , Å) при 50° С (рН 8,0–8,5)

Аминокислотный остаток	Наблюдаемый сигнал протонов при атоме	{Lys ²⁶ (SL)} нейротоксин II	{Lys ²⁷ (SL')} нейротоксин II	{Lys ²⁷ (SL)} нейротоксин II	
His ⁴	C2	<4 (>13)	<4 (>12)	<4 (>13)	
	C4	*	<4 (>12)	<4 (>13)	
His ³²	C2	<4 (>13)	14,6 (9,9)	28,6 (9,3 ^{2*})	
	C4	<4 (>13)	~18 (~9,6)	7,8 (11,5 ^{2*})	
Tyr ²⁵	C2, C6	<4 (>13)	17,2 (9,7)	12,2 (10,7)	
	C3, C5	<4 (>13)	15,8 (9,8)	29,8 (9,2)	
Trp ²⁸	C2	**	>40 (<8,4)	9,8 (11,1)	
	C4(C7)	**	~13,8 (~10)	<4 (>13)	
	C5(C6)	**	~5 (~12)	~5 (~12)	
	C6(C5)	**	~5 (~12)	~5 (~12)	
	C7(C4)	**	~6,6 (~11,4)	8,8 (11,3)	
Trp ²⁹	C2	5,4 (12,2)	>40 (<8,4)	~6,6 (~11,9)	
	C4(C7)	<4 (>13)	>40 (<8,4)	>40 (<8,8)	
	C5(C6)	**	>40 (<8,4)	>40 (<8,8)	
	C6(C5)	~5 (~12)	>40 (<8,4)	>40 (<8,8)	
	C7(C4)	**	>40 (<8,4)	>40 (<8,8)	
Ser ³⁰	C α	~11 (~10,8)	~19 (~9,5)	(9,2–12)	
Не идентифицирован	C α	<4 (>13)	<4 (>12)	**	
	»	C α	~5 (~12)	>30 (<8,8)	
	»	C α	18,2 (10,0)	27,2 (9,0)	
	»	C α	<4 (>13)	<4 (>12)	
	»	C α	<4 (>13)	<4 (>12)	
Thr-a	C γ	<4 (>13)	<4 (>12)	<4 (>12)	
	Thr-b	C γ	(>12)	(>11)	
	Thr-c	C γ	(>12)	(>11)	
	Thr-d	C γ	(>12)	(>11)	
	Thr ³⁵	C γ	(<10)	(8,8–11)	(10–13)
Thr-f	C γ	(>12)	(>11)	(>12)	
	Thr ³⁶	C γ'	(>12)	(<9)	(<9)
		C δ	(>12)	(<9)	(>9)
Thr ³⁷	C γ'	(\leq 9)	(\leq 9–12)	(\leq 12)	
	C δ	(\leq 9)	(\leq 9–12)	(\leq 12)	

* При введении метки сигнал расщепляется на две компоненты приблизительно равной интенсивности.

** При рН 4,0 $\nu_p \leq 4$ Гц, а $r \geq 13$ Å.

** Для 75% сигналов $\nu_p > 40$ Гц, для 25% $\nu_p \approx 4$ Гц.

** Величины не поддаются определению вследствие перекрывания сигналов.

заряженной группой может быть лишь гуанидиновая группа соседнего остатка Arg³³.

Хотя имеющиеся к настоящему времени экспериментальные данные не позволяют однозначно установить динамическую конформацию β -изгиба (31-й – 34-й аминокислотные остатки), можно предположить, что при рН > 7 доминирует конформация, показанная на рис. 16. В кислой среде в районе β -изгиба происходит локальный конформационный переход, в ходе которого увеличивается расстояние между спиновой меткой на ϵ -аминогруппе остатка Lys²⁷ и имидазольным кольцом остатка His³² (табл. 7). Переориентация имидазольного кольца (обладающего благодаря π -кольцевому току значительной магнитной анизотропией) вызывает изменение химических сдвигов протонов целого ряда аминокислотных остатков, входящих в состав центральной петли нейротоксина II (Trp²⁹, Ser³⁰, Thr³⁵ и Thr³⁶). Аналогичные изменения, наблюдавшиеся в спектрах ^1H -ЯМР нейротоксина III (табл. 2) и других гомологичных нейротоксинов [18, 20, 21], указывают на то, что в этих нейротоксинах также происходят конформационные изменения в районе β -изгиба.

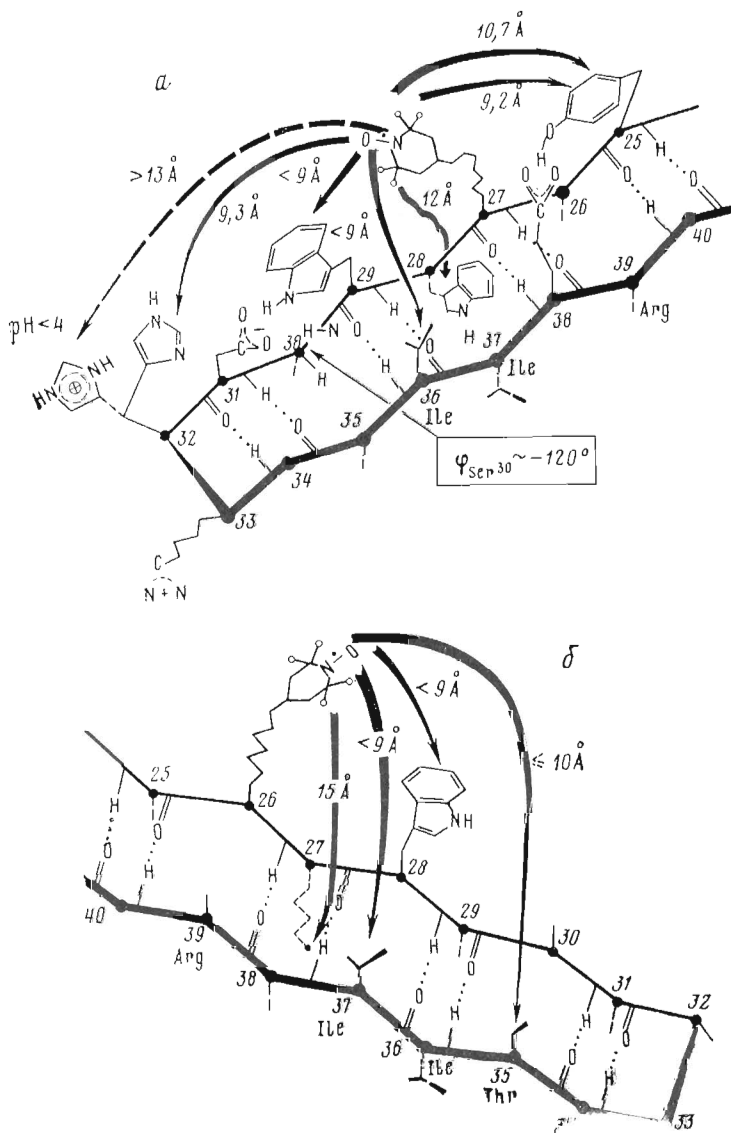


Рис. 16. Пространственное строение центральной петли нейротоксина II. *a* — вид сверху. Расстояния между иминоксильным радикалом и протонами боковых цепей получены для [Lys²⁷(SL)]нейротоксина II. *b* — вид снизу. Расстояния получены для [Lys²⁶(SL)]нейротоксина II

Следует отметить также, что две группы авторов, занимавшихся рентгеноструктурным анализом эрабутоксина *b*, предложили различающиеся модели строения молекулы эрабутоксина *b* в районе β -изгиба (31–34-й аминокислотные остатки) [24, 47]. Кроме того, как отмечено в работе [24], данные рентгеноструктурного анализа о типе этого β -изгиба были трудно интерпретируемы: для него были получены две альтернативные конформации, одна из которых как энергетически невыгодная была отброшена. Таким образом, данные спектроскопии ЯМР для нейротоксина II и результаты рентгеноструктурного анализа для гомологичного белка эрабутоксина *b* *L. semifasciata* [24, 26, 47] свидетельствуют о конформационной гибкости β -изгиба центральной петли нейротоксинов.

Предположение о конформационной лабильности этого участка молекул «коротких» нейротоксинов было сделано и в работах [48, 49]. Авторы, основываясь на теоретических конформационных расчетах «коротких» нейротоксинов, сравнении этих токсинов с С-алкалоидом E, антагонистом

ацетилхолинового рецептора, и исследовании КД-спектров одного из «коротких» нейротоксинов, предположили, что β -изгиб может быть расположен в районе 32–35-го аминокислотных остатков. При низкой ионной силе в растворах «коротких» нейротоксинов, по их мнению, устанавливается конформационное равновесие (конформеры различаются положением β -изгиба: 31–34-й или 32–35-й аминокислотные остатки). Повышение же ионной силы до концентраций, использованных для выращивания кристаллов эрабутоксина *b*, вызывает смещение конформационного равновесия в пользу конформера с β -изгибом в районе 31–34-го аминокислотных остатков [49].

Согласно полученным нами данным, в растворах с низкой ионной силой β -изгиб центральной петли «коротких» нейротоксинов расположен в районе 31–34-го аминокислотных остатков.

Предложенная нами модель пространственного строения центральной петли нейротоксина II в растворе хорошо согласуется с данными рентгеноструктурного анализа для эрабутоксина *b* [24, 26, 47]. Сходство между данной моделью и структурой эрабутоксина *b* в кристалле распространяется не только на конформацию основной цепи (антипараллельная β -структура с β -изгибом в районе 31–34-го аминокислотных остатков), но и на взаимное расположение боковых цепей аминокислотных остатков. Так, в обеих пространственных моделях боковые цепи остатков Phe^{36} и Tyr^{29} сближены, а карбоксильная группа остатка Glu^{38} образует водородную связь с фенольным гидроксилом остатка Tyr^{25} .

Сходство между моделью центральной петли нейротоксина II *N. n. oxiana* в растворе (рис. 16) и пространственной структурой этого участка молекулы гомологичного белка эрабутоксина *b* *L. semifasciata* [47] свидетельствует не только о подобии пространственных структур указанных нейротоксинов в растворе и кристалле, но и о справедливости использованного в настоящей работе подхода для изучения пространственной структуры белков методом спектроскопии ЯМР — измерения расстояний между ковалентно связанной с белком спиновой меткой и ядрами молекулы белка по уширению сигналов в спектрах ЯМР, индуцированному неспаренным электроном спиновой метки.

Экспериментальная часть

Выделение нейротоксина II из яда среднеазиатской кобры *N. n. oxiana* описано в работе [16].

Производное нейротоксина II с триштрофенильной меткой на ϵ -аминогруппе остатка Lys^{27} [36] получено при реакции нейротоксина II с 1,1 эквивалентами тринитробензолсульфокислоты по методике [50] при pH 8,6 и 35° С в течение 1,5 ч с использованием дополнительной очистки на СМ-целлюлозе СМ-32 и бюрексе 70. Положение метки установлено путем выделения из триптического гидролизата этого производного пептида 27–33, поглощающего при 345 нм.

Производные нейротоксина II, моноспин-меченные по ϵ -аминогруппам остатков Lys^{26} или Lys^{27} спиновыми метками типа SL или SL', были получены реакцией нейротоксина II соответственно с N-оксисукцинимидными эфирами 1-оксил-2,2,6,6-тетраметил-4-карбоксиметилпиперидина или 1-оксил-2,2,5,5-тетраметил-3-карбоксипирролина [39].

Нейротоксин III *N. m. mossambica* любезно предоставил проф. X. Роша (лаборатория биохимии Марсельского университета, Франция).

Спектры ^1H -ЯМР сняты в ампулах с внешним диаметром 5 мм в режиме импульсного облучения на спектрометре SC-300 (Varian, США). Химические сдвиги приведены относительно внутреннего стандарта 2,2-диметил-2-силапептан-5-сульфоната натрия. Концентрация нативных и модифицированных нейротоксинов в растворе $^2\text{H}_2\text{O}$ составляла 6 и 2 мМ соответственно в присутствии 0,1 М KCl. Значения pH отбачают прямому показанию pH-метра «Orion Research 601», снабженного комбинированным электродом 180 мм «Ingold M3». Для изменения pH использовались 0,1 и 1,0 М растворы ^2HCl и KO^2H . Зависимости химических сдвигов сигналов

протонов от рН среды были согласованы на ЭВМ по методу наименьших квадратов с теоретическими уравнениями

$$\delta_{\text{набл}} = \delta_{\text{H}^{\circ}} + \Delta\delta / [1 + 10^{n_{\text{H}}(\text{pH} - \text{p}K_a)}] \quad (1)$$

и

$$\delta_{\text{набл}} = \delta_{\text{H}^{\circ}} + \sum_i \Delta\delta_i / [1 + 10^{(\text{pH} - \text{p}K_a^i)}], \quad (2)$$

где $\delta_{\text{набл}}$ и $\delta_{\text{H}^{\circ}}$ — химические сдвиги сигнала при данном значении рН среды и в непротонированном состоянии соответственно; $\text{p}K_a = -\log K_a$; K_a^i — константа диссоциации i -й ионогенной группы; $\Delta\delta_i$ — изменение химического сдвига при депротонировании i -й ионогенной группы; n_{H} — коэффициент Хилла.

Моделирование спектров ^1H -ЯМР проведено в предположении, что сигналы имеют лоренцеву форму линии, на мини-ЭВМ типа «Hewlett-Packard 9825A», снабженной графопроектором типа HP 9872A. Путем изменения положения, ширины и интенсивности отдельных компонентов расчетного спектра определены соответствующие параметры участка спектра ^1H -ЯМР нейротоксина II, в котором расположены сигналы от ароматических протонов и слабopольных протонов $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ -групп. Полученные данные использованы как исходные при построении теоретических спектров спин-меченных производных нейротоксина II. При их моделировании варьировали ширину сигналов, а в ряде случаев — положение и интенсивности сигналов до максимального совпадения теоретического и экспериментального спектров. Необходимость изменения интенсивности и положения лоренцевых линий установлена при сопоставлении спектров ^1H -ЯМР нативного токсина и спин-меченных производных нейротоксина II с восстановленной спиновой меткой.

Для определения степени уширения сигналов от протонов CH_3 -групп, вызванных иминоксильным радикалом, сравнивались спектры ^1H -ЯМР спин-меченных производных нейротоксина II, производных с «погашенной» меткой и нативного токсина. В ряде случаев, когда такая оценка затруднена из-за перекрытия сигналов, применялись гомоядерный двойной резонанс и разностная спектроскопия: анализировались отклики от сигналов метильных протонов, полученные с помощью и без облучения радиочастотным полем протонов, спин-связанных с протонами метильных групп.

Спектры ЭПР спин-меченных производных нейротоксина II (10–100 мкМ) записаны на спектрометре ЭПР «Varian E-109» (9 ГГц), снабженном системой накопления сигналов E-900, в резонаторе E-238 с системой термостатирования E-258. Температура образца измерялась цифровым термометром 2400A «Fluke» с точностью $\pm 0,2^{\circ}$, колебания температуры образца за время съемки спектра не превышали $\pm 0,4^{\circ}$. Время корреляции движения спиновой метки (τ_{SL}) определено из спектров ЭПР по формуле (3) [51]:

$$\tau_{\text{SL}} = 6,65 \Delta H_+ (\sqrt{I_+/I_-} - 1) 10^{-10} \text{ с}, \quad (3)$$

где ΔH_+ — ширина компоненты спектра (Гц), расположенной в слабом поле; I_+ и I_- — интенсивности крайних компонент спектра в слабом и сильных полях соответственно.

Зависимости времени корреляции движения спиновых меток (τ_{SL}) от температуры согласованы методом наименьших квадратов на мини-ЭВМ типа «Hewlett-Packard» с уравнением Арренюса:

$$\tau_{\text{SL}}^{-1} = A e^{(-E/RT)}. \quad (4)$$

Энтропия активации движения спиновых меток определена по уравнению (5) [37]:

$$\tau_{\text{SL}} = \frac{kT}{h} e^{(\Delta S^{\ddagger}/R)} e^{(-\Delta H^{\ddagger}/RT)}, \quad (5)$$

где $\Delta H^{\#}$ и $\Delta S^{\#}$ — энтальпия и энтропия активации движения спиновых меток соответственно; T — температура, К; R , h и k — постоянные Ридберга, Планка и Больцмана.

Время поперечной релаксации неспаренного электрона спиновой метки (τ_{2s}) определено из формы ЭПР спектра спиновой метки по уравнению (6) [38]:

$$(\tau_{2s})^{-1} = 2,8 \cdot 10^6 \frac{\pi \sqrt{3}}{3} (\Delta H_+ + \Delta H_0 + \Delta H_-), \quad (6)$$

где ΔH_+ , ΔH_0 и ΔH_- — ширина (Гц) слабополюсной, центральной и сильнополюсной компонент спектра ЭПР соответственно. Предполагалось, что повышение напряженности магнитного поля (при съемке ЭПР-спектров напряженность поля составляла 0,32 Т, а при съемке спектров ЯМР — 7,05 Т) мало сказывается на величине τ_{2s} .

Влияние неспаренного электрона на ширину сигналов протонов в спектрах ¹H-ЯМР спин-меченных производных нейротоксина II. Индуцированные неспаренным электроном вклады во времена спин-спиновой релаксации протонов (T_{2p}) вызывают дополнительное уширение сигналов в спектрах ¹H-ЯМР спин-меченных производных нейротоксина II:

$$v_p = 1/\pi T_{2p}, \quad (7)$$

где v_p — уширение сигнала на половине высоты, индуцированное неспаренным электроном.

Согласно теории Соломона — Бломбергера [38], для ковалентно связанной с белком спиновой метки при условии, что плотностью неспаренного электрона вне атомов метки можно пренебречь, релаксационные вклады, индуцированные неспаренным электроном, определяются уравнением

$$\frac{1}{T_{2p}} = \frac{\gamma_i^2 g^2 \beta^2 S(S+1)}{r^6} \left(4\tau_{c,1} + \frac{3\tau_{c,1}}{1 + \omega_i^2 \tau_{c,1}^2} + \frac{13\tau_{c,2}}{1 + \omega_s^2 \tau_{c,2}^2} \right), \quad (8)$$

где γ_i — гиромангнитное отношение ядра; β — магнетон Бора, S — спин электрона; g — g -фактор электрона (для иминоксильного радикала — 2,0067 [52]); r — расстояние в Å между неспаренным электроном и соответствующим протоном; ω_i и ω_s — ларморовы частоты прецессии ядра и неспаренного электрона соответственно; $\tau_{c,1}$ и $\tau_{c,2}$ — времена корреляции диполь-дипольного взаимодействия протона и неспаренного электрона:

$$\frac{1}{\tau_{c,1}} = \frac{1}{\tau_R} + \frac{1}{\tau_{1,S}}, \quad (9)$$

$$\frac{1}{\tau_{c,2}} = \frac{1}{\tau_R} + \frac{1}{\tau_{2S}}, \quad (10)$$

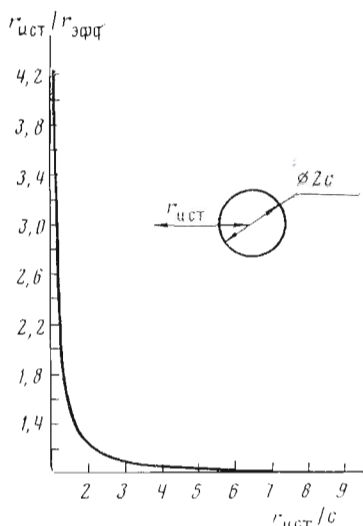
где τ_R — время вращательной корреляции радиус-вектора r (предполагается, что вращение молекулы изотропно и характеризуется единственным временем корреляции τ_R); τ_{1S} и τ_{2S} — времена продольной и поперечной релаксации неспаренного электрона спиновой метки.

Принимая во внимание, что $\tau_{1S} \geq \tau_{2S}$ [38] и для спин-меченных производных нейротоксина II $\tau_R \approx 4,3 \cdot 10^{-9}$ с [28, 36], а $\tau_{2S} \sim 2-2 \cdot 10^{-8}$ с (получено из анализа формы спектров ЭПР спин-меченных производных нейротоксина II по уравнению (6)) получаем

$$1/\tau_{c,1} \leq 1/\tau_{c,2} \approx 1/\tau_R. \quad (11)$$

В реальных случаях наряду с вращением молекулы как единого целого имеют место еще и различные виды внутримолекулярных движений (движения вдоль «ножки» спиновой метки и боковых цепей аминокислотных остатков, а также различные виды сегментных движений полипептидной цепи), оказывающие влияние на величину диполь-дипольного взаимодействия между неспаренным электроном и ядрами. Чтобы приблизительно учесть эти внутримолекулярные движения при расчете расстояний между иминоксильными радикалами и ядрами, время корреля-

Рис. 17. Зависимость $r_{\text{ист}}/r_{\text{эфф}}$ от $r_{\text{ист}}/c$ для случая, когда один из спинов (электронный или ядерный) неподвижен, а другой равномерно распределен внутри плоскости круга радиуса c . $r_{\text{ист}}$ — расстояние от центра круга до неподвижного спина. $r_{\text{эфф}}$ — расстояние между электронным и ядерным спинами, определенное по уравнению (12)



ции, τ_R , было заменено на τ_{SL} — время корреляции движения спиновой метки, определенное из спектров ЭПР спин-меченных производных нейротоксина II.

Из уравнений (7) и (8) после преобразований и сокращения последнего члена в уравнении (8) ввиду его малой величины по сравнению с двумя другими слагаемыми (при магнитном поле ЯМР спектрометра 7,05 Т), получено уравнение

$$r = 400 [f(\tau) / \nu_p]^{1/2}, \quad (12)$$

где

$$f(\tau) = 4\tau_{SL} + \frac{3\tau_{SL}}{1 + \omega_i^2 \tau_{SL}^2}, \quad (13)$$

которое использовалось в данной работе для оценки расстояний между неспаренным электроном спиновой метки и протонами белка.

Уравнение (12) пригодно для систем, где расстояние между иминоксильными радикалами и ядрами жестко фиксировано. В спин-меченных производных нейротоксина II это условие выполняться не будет, так как боковые цепи аминокислотных остатков и сама спиновая метка имеют некоторую свободу движения относительно молекулы белка. Поэтому вместо одного жестко фиксированного расстояния r необходимо рассматривать целый набор расстояний r_j , индивидуальный для каждого протона. В силу того что релаксационные вклады, индуцированные неспаренным электроном, обратно пропорциональны шестой степени рас-

стояния, истинное среднеарифметическое расстояние $r_{\text{ист}} = \left(\sum_{j=1}^N r_j \right) / N$

будет отличаться от эффективного расстояния $1/r_{\text{эфф}} = \left[\left(\sum_{j=1}^N 1/r_j^6 \right) \frac{1}{N} \right]^{1/6}$,

полученного по уравнению (12). На рис. 17 показана зависимость $r_{\text{ист}}/r_{\text{эфф}}$ от $r_{\text{ист}}/c$ для случая, когда один из спинов (ядерный или электронный) равномерно распределен внутри круга радиуса c , а второй, находящийся в плоскости круга, неподвижен. Из рис. 17 видно, что $r_{\text{эфф}}$ заметно меньше $r_{\text{ист}}$, когда $r_{\text{ист}}$ близко к радиусу круга.

Для исследованных нами спин-меченных производных нейротоксина II экспериментально установленные эффективные расстояния (табл. 7) не должны сильно отличаться от усредненных (истинных) расстояний по следующим причинам. Во-первых, стерические препятствия, создаваемые боковыми цепями соседних аминокислотных остатков в пространственной структуре центральной петли, должны приводить к ограничению радиуса

вращения протонов боковых цепей и иминоксильных радикалов. Действительно, из данных ЭПР [28] следует, что метки на остатках Lys²⁶ и Lys²⁷ нейротоксина II сильно иммобилизованы. Во-вторых, уменьшение различий между эффективными и истинными расстояниями связано также с тем, что в данной работе вычислены расстояния для протонов, достаточно удаленных от иминоксильных радикалов (на расстояния свыше 9 Å).

Авторы выражают благодарность А. М. Сурину и К. А. Плужникову за помощь в получении модифицированных нейротоксинов и В. Т. Иванову за интерес к работе и ценные критические замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Karlsson E. In: Snake venoms/Ed. Lee C.-V. Berlin - Heidelberg - New York: Springer Verlag, 1979, p. 159-212.
2. Grishin E. V., Sukhikh A. P., Lukyanchuk N. N., Slobodyan L. N., Lipkin V. M., Ovchinnikov Yu. A., Sorokin V. M. FEBS Lett., 1973, v. 36, № 1, p. 77-78.
3. Eaker D., Porath J. 7th Int. Congress Biochem. Tokyo, 1967. Vol. VIII-3, Abstracts III, p. 499. Tokyo: The Science Council of Japan, 1967.
4. Gregoire J., Rochat H. Eur. J. Biochem., 1977, v. 80, № 1, p. 283-293.
5. Yang C. C., Yang H. J., Huang J. S. Biochim. et biophys. acta, 1969, v. 188, № 1, p. 65-77.
6. Sato S., Tamiya N. Biochem. J., 1971, v. 122, № 4, p. 453-461.
7. Tamiya N., Abe H. Biochem. J., 1972, v. 130, № 2, p. 547-555.
8. Yang C. C., Chang C. C., Hayashi K., Suzuki T., Ikeda K. Biochim. et biophys. acta, 1968, v. 168, № 2, p. 373-376.
9. Nakai K., Sasaki T., Hayashi K. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1971, v. 44, № 4, p. 893-897.
10. Chicheportiche R., Rochat C., Samprieri F., Lazdunski M. Biochemistry, 1972, v. 11, № 9, p. 1681-1691.
11. Tsetlin V. I., Mikhaleva I. I., Myagkova M. A., Senyavina L. B., Arseniev A. S., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. In: Peptides: chemistry, structure and biology/Eds Walter R., Meinhofer J. Ann. Arbor: Ann Arbor Sci., 1975, p. 935-941.
12. Menez A., Boquet F., Tamiya N., Fromageot P. Biochim. et biophys. acta, 1976, v. 453, № 1, p. 121-132.
13. Chen Y. H., Lo T. B., Yang J. T. Biochemistry, 1977, v. 16, № 9, p. 1826-1830.
14. Takamatsu T., Harada I., Hayashi K. Biochim. et biophys. acta, 1980, v. 622, № 2, p. 189-200.
15. Лабуев Н. Р., Плужников К. А., Траханов С. Д., Ефремов Е. С., Цеглин В. И. Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 6, с. 836-846.
16. Arseniev A. S., Balashova T. A., Utkin Yu. N., Tsetlin V. I., Bystrov V. F., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. Eur. J. Biochem., 1976, v. 71, № 2, p. 595-606.
17. Lauterwein J., Wüthrich K., Schweitz H., Vincent J. P., Lazdunski M. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1977, v. 76, № 4, p. 1071-1078.
18. Lauterwein J., Lazdunski M., Wüthrich K. Eur. J. Biochem., 1978, v. 92, № 2, p. 361-371.
19. Inagaki F., Miyazawa T., Hori H., Tamiya N. Eur. J. Biochem., 1978, v. 89, № 2, p. 433-442.
20. Арсеньев А. С., Сурин А. М., Уткин Ю. Н., Цеглин В. И., Быстров В. Ф., Иванов В. Т., Овчинников Ю. А. Биоорг. химия, 1978, т. 4, № 2, с. 197-207.
21. Endo T., Inagaki F., Hayashi K., Miyazawa T. Eur. J. Biochem., 1979, v. 102, № 2, p. 417-430.
22. Inagaki F., Tamiya N., Miyazawa T. Eur. J. Biochem., 1980, v. 109, № 1, p. 129-138.
23. Tsernoglou D., Petsko G. A. FEBS Lett., 1976, v. 68, № 1, p. 1-4.
24. Tsernoglou D., Petsko G. A., McQueen J. E., Hermans Jr. J. Science, 1977, v. 197, № 4311, p. 1378-1380.
25. Low B. W., Preston H. S., Salo A., Rosen L. S., Searl J. E., Rudko A. D., Richardson J. S. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, № 9, p. 2991-2994.
26. Low B. W. In: Snake venoms/Ed. Lee C.-Y. Berlin - Heidelberg - New York: Springer Verlag, 1979, p. 213-257.
27. Tsetlin V. I., Arseniev A. S., Utkin Yu. N., Gurevich A. Z., Senyavina L. B., Bystrov V. F., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. Eur. J. Biochem., 1979, v. 94, № 2, p. 337-346.
28. Tsetlin V. I., Karlsson E., Arseniev A. S., Utkin Yu. N., Surin A. M., Pashkov V. S., Pluzhnikov K. A., Ivanov V. T., Bystrov V. F., Ovchinnikov Yu. A. FEBS Lett., 1979, v. 106, № 1, p. 47-52.
29. Bystrov V. F., Ivanov V. T., Okhanov V. V., Miroshnikov A. I., Arseniev A. S., Tsetlin V. I., Pashkov V. S., Karlsson E. In: Advances in solution chemistry/Eds Bertini I., Lunazzi L., Dei A. New York - London: Plenum Press, 1981, p. 231-251.
30. Bradbury J. H., Chapman B. E., Pellegrino F. A. J. Amer. Chem. Soc., 1973, v. 95, № 18, p. 6139-6140.

31. Arseniev A. S., Pashkov V. S., Pluzhnikov K. A., Rochat H., Bystrov V. F. Eur. J. Biochem., 1981, v. 118, № 3, p. 453-462.
32. Bundi A., Wüthrich K. Biopolymers, 1979, v. 18, № 2, p. 285-297.
33. Wagner G., DeMarco A., Wüthrich K. Biophys. Struct. Mechanism, 1976, v. 2, № 2, p. 139-158.
34. Быстров В. Ф., Оханов В. В., Арсеньев А. С., Афанасьев В. А., Гуревич А. З. Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 3, с. 386-392.
35. Wüthrich K. NMR in biological research: peptides and proteins. N. Y.: American Elsevier, 1976.
36. Сурин А. М., Уткин Ю. Н., Плазников К. А., Ефремов Е. С., Цетлин В. И. Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 3, с. 342-356.
37. Лухтенштейн Г. И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. М.: Наука, 1974.
38. Dwek R. A. Nuclear magnetic resonance (NMR) in biochemistry. Oxford: Clarendon Press, 1973.
39. Ivanov V. T., Tsetlin V. I., Karlsson E., Arseniev A. S., Utkin Yu. N., Pashkov V. S., Surin A. M., Pluzhnikov K. A., Bystrov V. F. In: National toxins / Eds Eaker D., Wadström T. Oxford - New York: Pergamon Press, 1980, p. 523-530.
40. Dobson C. M., Hoch J. C., Olejniczak E. T., Poulsen F. M. Biophys. J., 1980, v. 32, № 1, p. 625-627.
41. Bystrov V. F., Arseniev A. S., Gavrilov Yu. D. J. Magn. Res., 1978, v. 30, № 2, p. 151-184.
42. Harada I., Takamatsu T., Shimanouchi T., Miyazawa T., Tamiya N. J. Phys. Chem., 1976, v. 80, № 11, p. 1153-1156.
43. Yü N. T., Lin T. S., Tu A. T. J. Biol. Chem., 1975, v. 250, № 5, p. 1782-1785.
44. Tanford C. In: Advances in protein chemistry / Eds Anfinsen C. B., Bailey Jr. K., Anson M. L., Edsall J. T. New York - London: Acad. Press, 1962, p. 69-165.
45. Shire J. S., Hanania G. I. H., Gurd F. R. N. Biochemistry, 1974, v. 13, № 14, p. 2967-2974.
46. Tanokura M., Tasumi M., Miyazawa T. Biopolymers, 1976, v. 15, № 2, p. 393-401.
47. Kimball M. R., Sato A., Richardson J. S., Rosen L. S., Low B. W. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1979, v. 88, № 3, p. 950-959.
48. Drake A. F., Dufton M. J., Hider R. C. FEBS Lett., 1977, v. 83, № 2, p. 202-206.
49. Hider R. C., Dufton M. J. In: Natural toxins / Eds Eaker D., Wadström T. Oxford - New York: Pergamon Press, 1980, p. 515-522.
50. Chang C. C., Yang C. C., Nakai K., Hayashi K. Biochim. et biophys. acta, 1971, v. 251, № 3, p. 334-344.
51. Анциферова Л. И., Вассерман Л. М., Иванова А. Н., Лившиц В. А., Наземец И. С. Атлас спектров электронного парамагнитного резонанса спиновых меток и зондов. М.: Наука, 1977.
52. Bordeaux D., Lajzerowicz J., Briere R., Lemaire H., Rassat A. Org. Mag. Res., 1973, v. 5, № 1, p. 47-52.

Поступила в редакцию
25.XI.1981

NMR STUDY ON SOLUTION CONFORMATION OF THE CENTRAL LOOP IN «SHORT» NEUROTOXINS

PASHKOV V. S., ARSENIIEV A. S., UTKIN Yu. N.,
TSETLIN V. I., BYSTROV V. F.

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

¹H NMR studies were done on neurotoxin II *Naja naja oxiana*, neurotoxin III *Naja mossaibica mossaibica*, and four neurotoxin II derivatives: having a trinitrophenyl group at Lys²⁷ ε-amino group, a spin label of piperidine series at Lys²⁶ or Lys²⁷, or a pyrroline type spin label at Lys²⁷. EPR spectra of the three mono spin labeled derivatives were studied. Neurotoxins II and III are shown to have a similar spatial structure in solution. Microenvironment of the amino acid residues in the central loop of these neurotoxins is described. The correlation times and activation parameters for the rotational motion of the spin labels at Lys²⁶ and Lys²⁷ residues indicate that the labels are situated on the surface of the protein globule. From the contributions into proton relaxation times induced by unpaired electrons of the spin labels, the distances from iminoxyl radicals to individual protons of neurotoxin II are calculated. In total, the results obtained demonstrate the central loop of «short» neurotoxins to represent in solution the antiparallel β-structure, the amino acid residues 31-34 forming a β-turn. Protonation of the His³² imidazole ring is accompanied by a conformational change which moves imidazole ring away from the spin label at the Lys²⁷ residue.