



УДК 577.322.52 : 591.145-546 : 543.422.23

ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА И ОТНЕСЕНИЕ СИГНАЛОВ
В ДВУМЕРНЫХ СПЕКТРАХ ^1H -ЯМР ИНСЕКТОТОКСИНА
I₅A BUTHUS EUPEUS

Арсеньев А. С., Кондаков В. И., Майторов В. Н.,
Волкова Т. М., Гришин Е. В., Быстров В. Ф.,
Овчинников Ю. А.

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

Исследованы двумерные спектры (SECSY, COSY, NOESY) ^1H -ЯМР инсектотоксина *I₅A* из яда скорпиона *Buthus eupeus* в растворе $^2\text{H}_2\text{O}$ и H_2O . В результате получено практически полное отнесение сигналов. Анализом ядерного эффекта Оверхаузера между протонами соседних по аминокислотной последовательности остатков установлена вторичная структура инсектотоксина, которая включает в себя α -спираль (остатки 11–21) и антипараллельную β -структуру (остатки 23–34) с β -изгибом, образованным остатками Phe²⁷-Gly²⁸-Pro²⁹-Gln³⁰. Все пептидные связи X-Pro имеют *транс*-конфигурацию. Первичная структура изотоксина откорректирована с помощью ЯМР и подтверждена методами химического анализа.

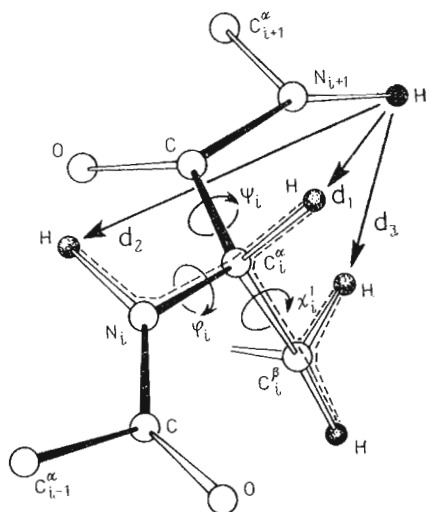
Среди компонентов яда скорпионов особый интерес вызывают полипептидные нейротоксины молекулярной массы от 4000 до 8000 с четырьмя внутримолекулярными дисульфидными связями. Эти уникальные биорегуляторы в настоящее время эффективно используются в качестве инструментов исследования молекулярных механизмов функционирования быстрых натриевых каналов электровозбудимых мембран [1–3]. Нейротоксины яда скорпионов обладают выраженной селективностью действия: в яде одного вида скорпионов могут содержаться токсичные полипептиды, действующие на нервную систему только позвоночных или только насекомых [4, 5]. Длинные нейротоксины (60–70 аминокислотных остатков) достаточно хорошо изучены, а для токсина 3 из яда *Centruroides sculpturatus* методом рентгеноструктурного анализа установлена пространственная структура [6, 7]. Вместе с тем в настоящее время отсутствуют какие-либо данные, характеризующие пространственную организацию коротких инсектотоксинов яда скорпиона. Ранее нами была установлена аминокислотная последовательность трех инсектотоксинов из яда *Buthus eupeus* [8–10]. В настоящей работе проведено исследование вторичной структуры инсектотоксина *I₅A*, принадлежащего к структурной группе «коротких» инсектотоксинов [10], с помощью метода двумерной спектроскопии ЯМР, недавно вошедшего в практику конформационного анализа пептидов [11–15].

Первым и наиболее ответственным этапом анализа пространственной структуры полипептида методом спектроскопии ^1H -ЯМР является отнесение сигналов в спектре к определенным протонам исследуемого пептида. Широко применяющиеся в настоящее время мультirezонаансные методы в сочетании с разностной спектроскопией, использование природных и синтетических аналогов позволяют, как правило, выделить и охарактеризовать ограниченное число сигналов в наиболее простых для интерпретации областях ЯМР-спектра [16, 17].

Применение методов двумерной спектроскопии ^1H -ЯМР при исследовании пространственной структуры инсектотоксина *I₅A* позволило провести практически полное отнесение сигналов протонов в спектрах и оха-

Сокращения: COSY – двумерная корреляционная спектроскопия, SECSY – двумерная спин-эхо-корреляционная спектроскопия, NOESY – двумерная спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера, ЯЭО – ядерный эффект Оверхаузера.

Рис. 1. Фрагмент основной полипептидной цепи. Стрелками указаны расстояния между амидным протоном $N_{i+1}H$ и протонами предыдущего в аминокислотной последовательности остатка: $C_i^{\alpha}H$ (d_1), N_iH (d_2) и $C_i^{\beta}H$ (d_3). Пунктирными линиями обозначены спин-спиновые J -связи между протонами аминокислотного остатка



характеризовать вторичную структуру молекулы. Дальнейший анализ спектров должен привести к определению пространственной структуры и динамических особенностей инсектотоксина в растворе.

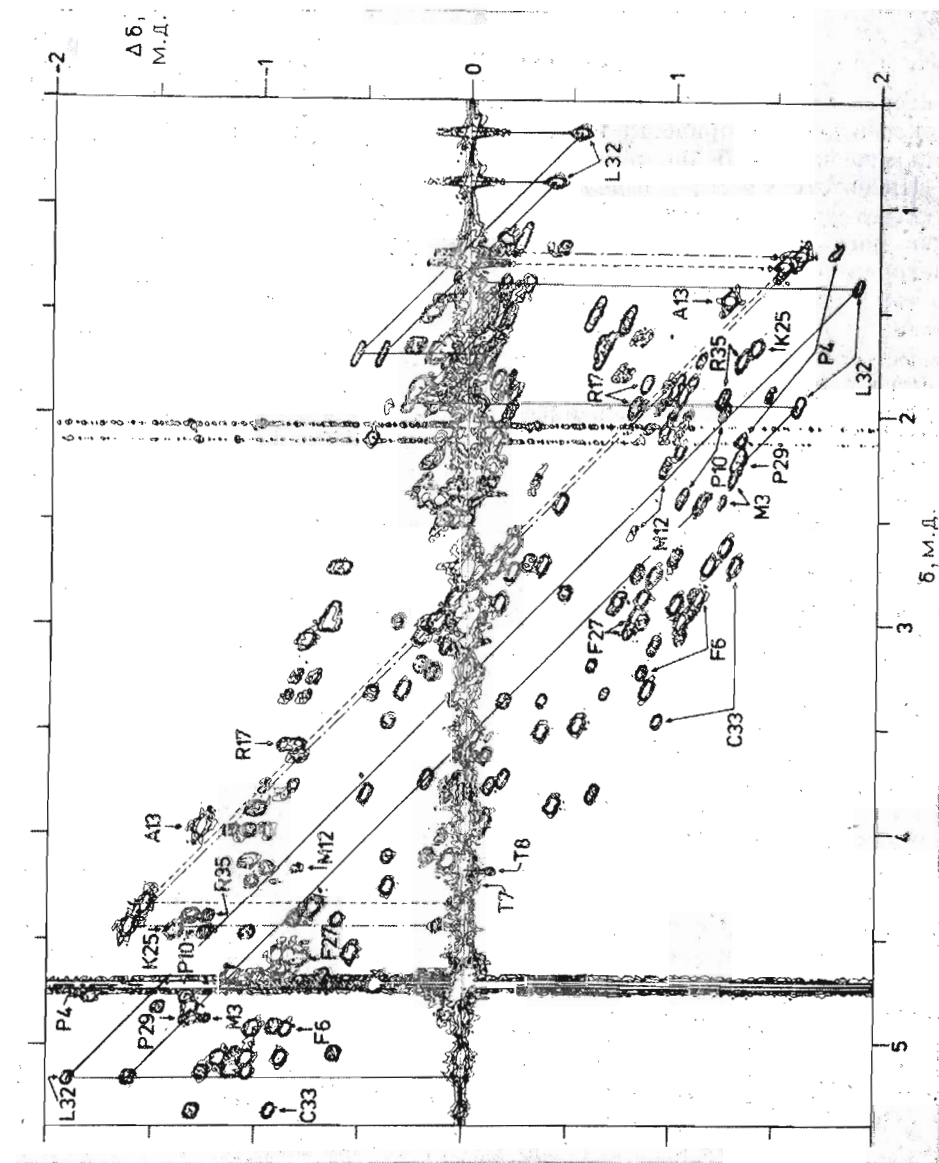
Инсектотоксин I_5A , выделенный из яда кавказского подвида скорпиона *V. eurus* по методу [10], имеет аминокислотный состав, молекулярную массу и хроматографическую подвижность, идентичные характеристикам инсектотоксина I_5 [10]. Однако при анализе данных спектроскопии ЯМР токсина I_5A были обнаружены некоторые структурные различия этих полипептидов, подтвержденные затем прямыми химическими методами. В положениях 14, 23 и 24 полипептидной цепи инсектотоксина I_5A были идентифицированы соответственно остатки лизина, аспарагина и глицина, тогда как в инсектотоксине I_5 в этих положениях находятся остатки аспарагина, глицина и лизина [10]. Инсектотоксины I_5 и I_5A являются изотоксинами, обладающими идентичными свойствами. Наличие изотоксинов, по-видимому, можно объяснить тем, что для выделения токсичных полипептидов были использованы разные образцы яда скорпиона.

Анализ спектров 1H -ЯМР. Для отнесения сигналов получены двумерные спектры 1H -ЯМР растворов инсектотоксина в H_2O и 2H_2O при pH 2,9 и температурах 30 и 50°С. Эти условия были выбраны потому, что при pH 2,9 скорость обмена амидных протонов и протонов растворителя минимальна [18], а температура денатурации инсектотоксина превышает 70°С.

На рис. 1 представлен фрагмент полипептидной цепи, иллюстрирующий общую схему отнесения сигналов вдоль полипептидной цепи от остатка к остатку. Протоны аминокислотного остатка связаны между собой спин-спиновыми взаимодействиями (J -связями), которые проявляется в двумерных спектрах корреляционной (COSY) или спин-эхо-корреляционной спектроскопии (SECSY) [19, 20]. Анализ этих спектров позволяет выделить спиновые системы аминокислотных остатков. Затем, зная аминокислотную последовательность пептида, можно связать аминокислотные остатки между собой по цепи с помощью ядерного эффекта Оверхаузера через расстояния d_1 , d_2 и d_3 между протоном NH и соответственно протонами $C^{\alpha}H$, NH и $C^{\beta}H$ предыдущего по последовательности остатка (d -связи) [11–15]. Как было показано в работе [12], по крайней мере одно из этих расстояний будет достаточно коротким для наблюдения ядерного эффекта Оверхаузера в двумерном спектре ядерного эффекта Оверхаузера (NOESY), который содержит информацию о достаточно сильных диполь-дипольных взаимодействиях в молекуле.

Рис. 2–4 дают общее представление о спектральных свойствах инсектотоксина. Алифатическая область SECSY-спектра показана на рис. 2.

Рис. 2. Спектральная область δ 0,5–5,4 м.д. SECSY-спектра инсектоксина в $^2\text{H}_2\text{O}$ при pH 2,9 (30°С). Цифровое разрешение 1,2 Гц вдоль оси $\Delta\delta$ и 2,4 Гц вдоль оси δ . Спектр получен накоплением в течение 22 ч. Сильная вертикальная полоса при 4,7 м.д. обусловлена остаточными протонами HO^2H . Протон-протонные J-связи указаны для следующих аминокислотных остатков: Thr¹ (пунктир), Thr⁸ (штрих-пунктир) и Leu³² (сплошные линии). Крест-лики стрелками для аминокислотных остатков Met³, Pro⁴, Phe⁵, Pro¹⁰, Met¹², Ala¹³, Arg¹⁷, Lys²³, Phe²⁷, Pro²⁹, Cys³³ и Arg³⁵. На этом рисунке и далее обозначение остатков дано в одноклеточном коде. Цифры указывают отнесение индивидуальных крест-пику к положению в аминокислотной последовательности



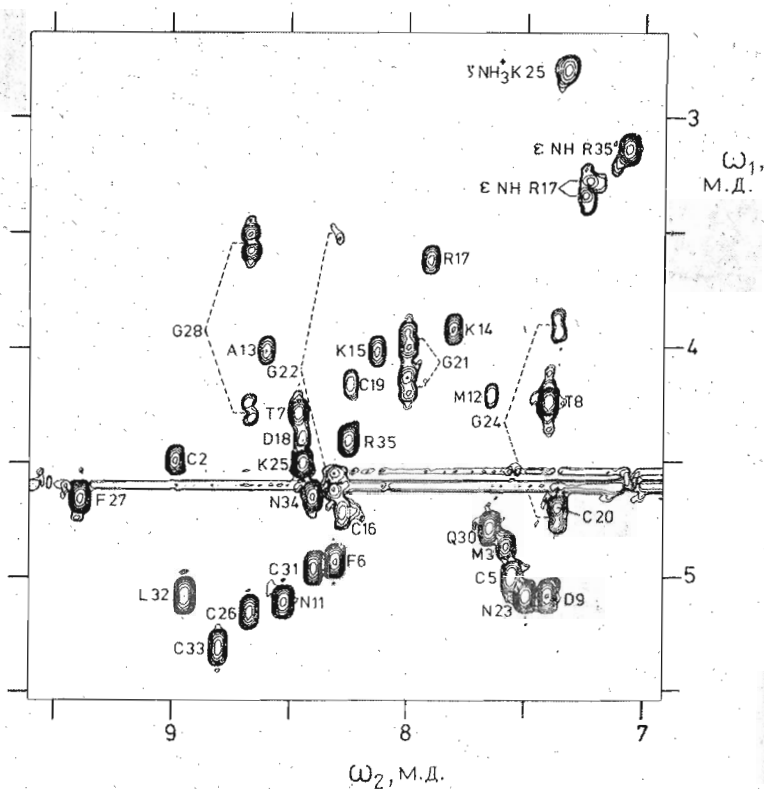


Рис. 3. Спектральная область ω_1 2,6–6,5 м. д., ω_2 6,9–9,6 м. д. COSY-спектра инсектотоксина в H_2O (10% $^2\text{H}_2\text{O}$) при pH 2,9 (50° С). Спектр получен накоплением в течение 22 ч. Сильная горизонтальная полоса при 4,6 м. д. обусловлена сигналом растворителя. Показано соотнесение сигналов протонов $\text{NH}-\text{C}^\alpha\text{H}$. В правом верхнем углу диаграммы расположены кросс-пики протонов $\text{N}^\epsilon\text{H}-\text{C}^\delta\text{H}_2$ боковых цепей остатков $\text{Arg}^{17, 35}$ и протонов $\text{N}^\epsilon\text{H}_3-\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ остатка Lys^{25}

Спектр содержит большое число хорошо разрешенных кросс-пиков, которые обусловлены J -связями между протонами спиновых систем аминокислотных остатков. J -Связи между амидными протонами и протонами C^αH проявляются в виде кросс-пиков в COSY-спектре инсектотоксина в H_2O (рис. 3). Каждый аминокислотный остаток дает только один кросс-пик $\text{NH}-\text{C}^\alpha\text{H}$, за исключением остатков глицина, которые обычно дают два кросс-пики с двумя протонами C^αH , и остатков пролина, которые не имеют протона NH и, следовательно, не проявляются в указанной области COSY-спектра. Кросс-пик $\text{NH}-\text{C}^\alpha\text{H}$ для N-концевого остатка обычно не наблюдается из-за быстрого обмена атомов водорода группы NH_3^+ с растворителем. Число кросс-пиков $\text{NH}-\text{C}^\alpha\text{H}$ в COSY-спектре соответствуют ожидаемому количеству исходя из аминокислотной последовательности инсектотоксина (рис. 3).

NOESY-спектр инсектотоксина в H_2O содержит большое число кросс-пиков во всех областях спектра (рис. 4). Так, например, в области 9,5–6,5 м. д. расположены кросс-пики, отвечающие d_2 -связям протонов NH (рис. 1), над ней расположены кросс-пики между протонами NH и C^αH соседних по полипептидной цепи остатков (d_1 -связи), еще выше — область кросс-пиков между протонами NH и C^βH соседних остатков (d_3 -связи). Отметим, что в приведенном на рис. 4 NOESY-спектре кросс-пики достаточно хорошо разрешены. Это очень важно как для отнесения сигналов, так и для конформационного анализа пептида.

Отнесение спиновых систем. Первым шагом в отнесении сигналов является выделение протонных спиновых систем отдельных аминокислотных остатков. Известно [21, 22], что спиновые системы аминокислотных

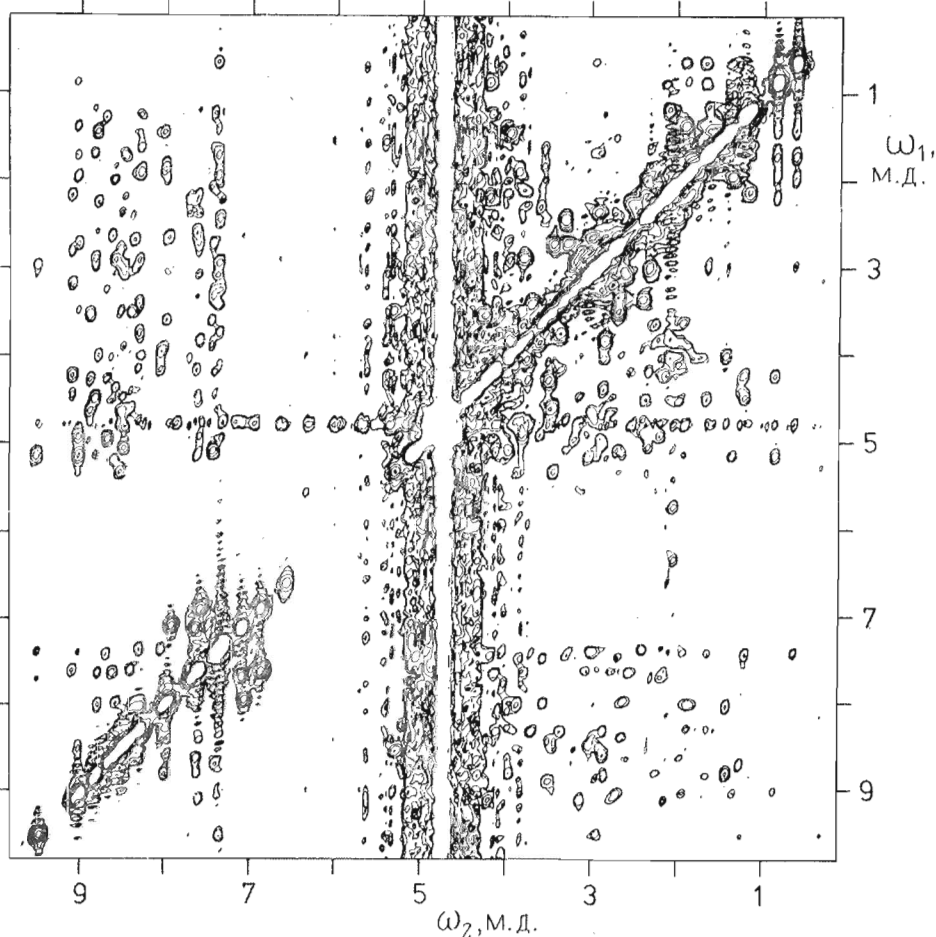


Рис. 4. NOESY-спектр раствора инсектотоксина в H_2O (10% $^2\text{H}_2\text{O}$) при pH 2,9 (30°C). Спектр получен накоплением в течение 23 ч. Сильная вертикальная полоса при химическом сдвиге сигнала H_2O (4,7 м.д.) обусловлена радиочастотным насыщением сигнала растворителя (см. «Экспер. часть»)

остатков можно подразделить на группы в зависимости от числа протонов при α -, β -, γ -, δ - и ϵ -углеродных атомах. Практически такую дифференциацию в ^1H -ЯМР-спектре можно провести сочетанием гомоядерного мультирезонанса и разностной спектроскопии [21–23] или, что быстрее и надежнее, использованием двумерной спектроскопии типа SECSY или COSY. При этом удастся избежать неоднозначности в выделении спиновых систем, обусловленной побочными эффектами, возникающими при применении мультирезонансных методик для сильно перекрытых областей ^1H -ЯМР-спектра.

Наиболее легко выделить спиновые системы AX четырех остатков глицина в SECSY-спектре инсектотоксина в $^2\text{H}_2\text{O}$ (рис. 5), так как только для этих остатков оба кросс-пика, отвечающие химическим сдвигам двух C^α -протонов, имеют ярко выраженную дублетную структуру. Далее, оба C^α -протона связаны спин-спиновым взаимодействием с одним и тем же амидным протоном, и это хорошо проявляется в COSY-спектре инсектотоксина в H_2O (рис. 3).

Достаточно просто выделить спиновую систему A_3X протонов $\text{C}^\alpha\text{H}-\text{C}^\beta\text{H}_3$ единственного в молекуле остатка аланина и спиновые системы AMX_3 протонов $\text{C}^\alpha\text{H}-\text{C}^\beta\text{H}-\text{C}^\gamma\text{H}_3$ двух остатков треонина (рис. 2).

Согласно аминокислотному составу, в спектре инсектотоксина должны наблюдаться 15 спиновых систем типа ABX или A_2X , соответствующи-

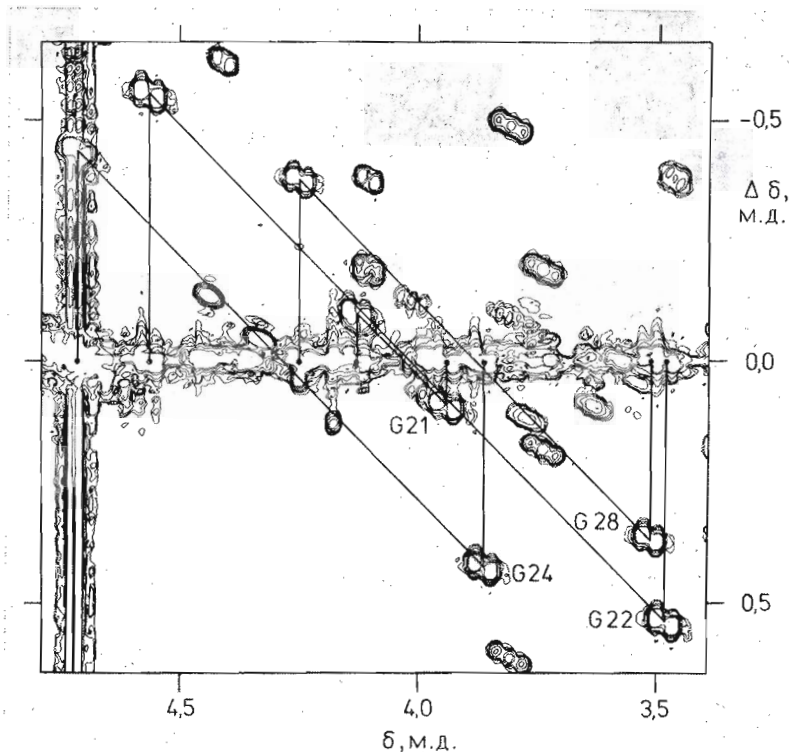


Рис. 5. Спектральная область δ 3,4–4,7 м.д. SECSY-спектра инсектотоксина (фрагмент спектра рис. 2). Линиями показаны протон-протонные J -связи для спиновых систем AX аминокислотных остатков глицина

щих фрагментам $C^\alpha H-C^\beta H_2$, которые не содержат протонов в γ -положении [22]. К этой группе относятся восемь остатков цистеина, три — аспарагина, два — аспарагиновой кислоты и два — фенилаланина. Спиновые системы всех перечисленных 15 аминокислотных остатков выделены в SECSY-спектрах (рис. 2, 6 и 7).

Сигналы от протонов $C^\alpha H-C^\beta H_2$ и кольцевых протонов двух остатков фенилаланина были идентифицированы следующим образом. Сигналы от протонов ароматических колец остатков фенилаланина расположены в очень узком спектральном диапазоне: 7,36–7,27 м.д. Поэтому спиновые системы этих протонов оказалось невозможным выделить в SECSY-спектрах. Однако известно [12], что ароматические протоны и протоны $C^\beta H_2$ остатка фенилаланина достаточно близки во всем диапазоне торсионных углов $\chi^2 (C^\beta-C^\gamma)$ и между ними наблюдается ЯЭО [13–15]. Это обстоятельство использовано нами для выделения сигналов протонов $C^\alpha H-C^\beta H_2$ двух остатков фенилаланина из 15 спиновых систем ABX и A_2X в спектрах инсектотоксина. На рис. 8 показана область ароматических и алифатических протонов в NOESY-спектре. Протоны $C^\beta H_2$ только двух спиновых систем ABX (т.е. спиновых систем остатков Phe⁶ и Phe²⁷) дают ЯЭО с ароматическими протонами с δ 7,36 и 7,33 м.д.; кроме того, протоны $C^\alpha H$ двух выделенных спиновых систем дают ЯЭО с теми же ароматическими протонами.

Спиновая система алифатических протонов единственного в молекуле остатка лейцина выделена в SECSY-спектре (рис. 2). Отнесение было начато с сигналов от двух групп δ - CH_3 с δ 0,65 и 0,89 м.д. и продолжено по всем J -связям в спиновой системе остатка лейцина.

Следующим шагом было соотнесение протонов $C^\alpha H$ идентифицированных спиновых систем с амидными протонами полипептидной цепи. Это не вызывает затруднений, если сигнал протона $C^\alpha H$ не перекрыт с другими сигналами, как, например для остатка Cys³³ (рис. 2, 3). Если же про-

Рис. 6. Спектральная область δ 1,7–4,9 м.д. SECSY-спектра (фрагмент спектра рис. 2) инсектоксина. Протон-протоновые J -связи показаны для спиновой системы АВХ протонов $C^{\alpha}H-C^{\beta}H_2$ остатка Cys^{20} (пунктир), для протонов $C^{\alpha}H-C^{\beta}H_2$ (пунктир), для протонов $C^{\alpha}H-C^{\beta}H_2$ (пунктир), для протонов $C^{\alpha}H-C^{\beta}H_2$ (пунктир), для протонов $C^{\alpha}H-C^{\beta}H_2$ (пунктир) и для протонов $C^{\alpha}H-C^{\beta}H_2$ (пунктир) Pro^{29} (сплошные линии). Стрелками указаны кросс-пики протонов $C^{\alpha}H-C^{\beta}H_2$ остатков Met¹, Cys², Lys¹⁴, Lys¹⁵, Asp¹⁸, Cys²¹ и Asp³⁴.

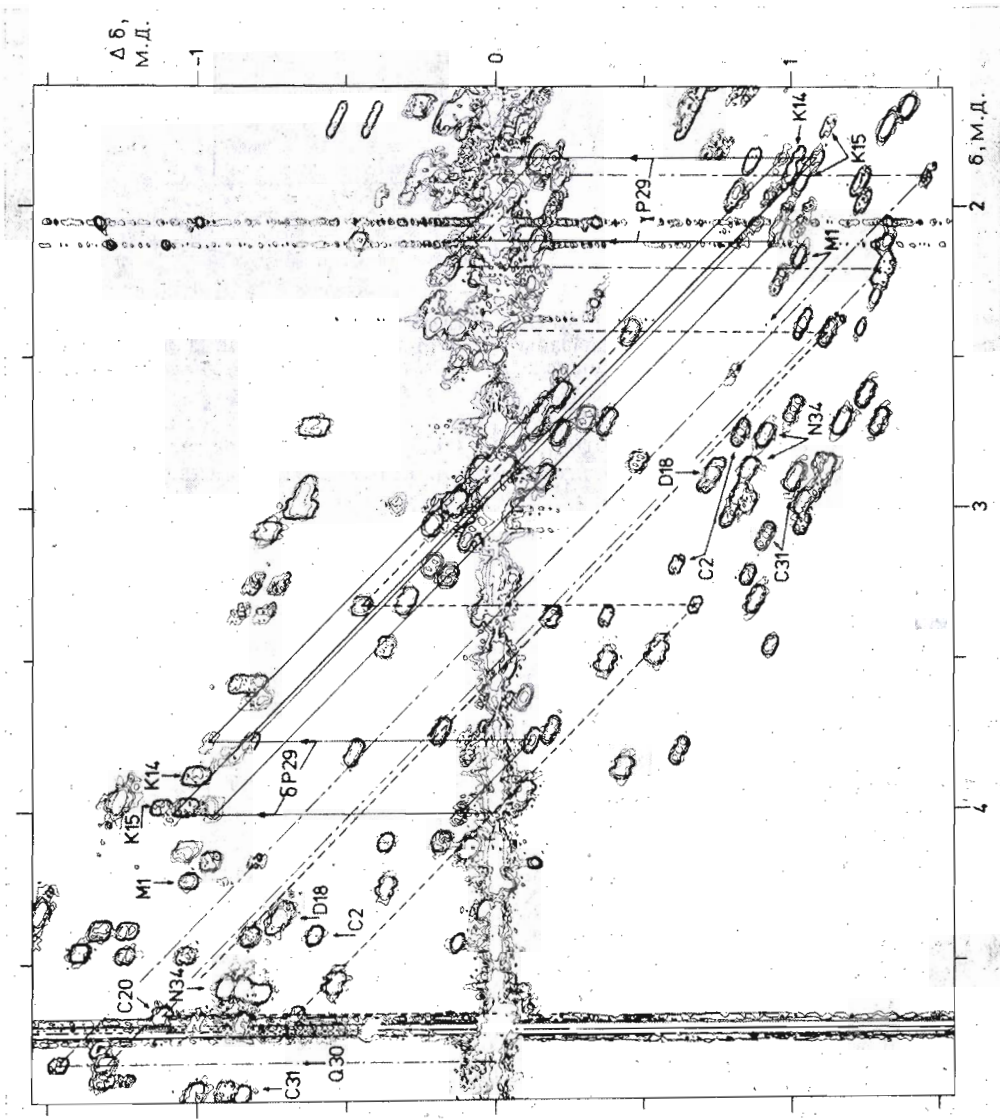
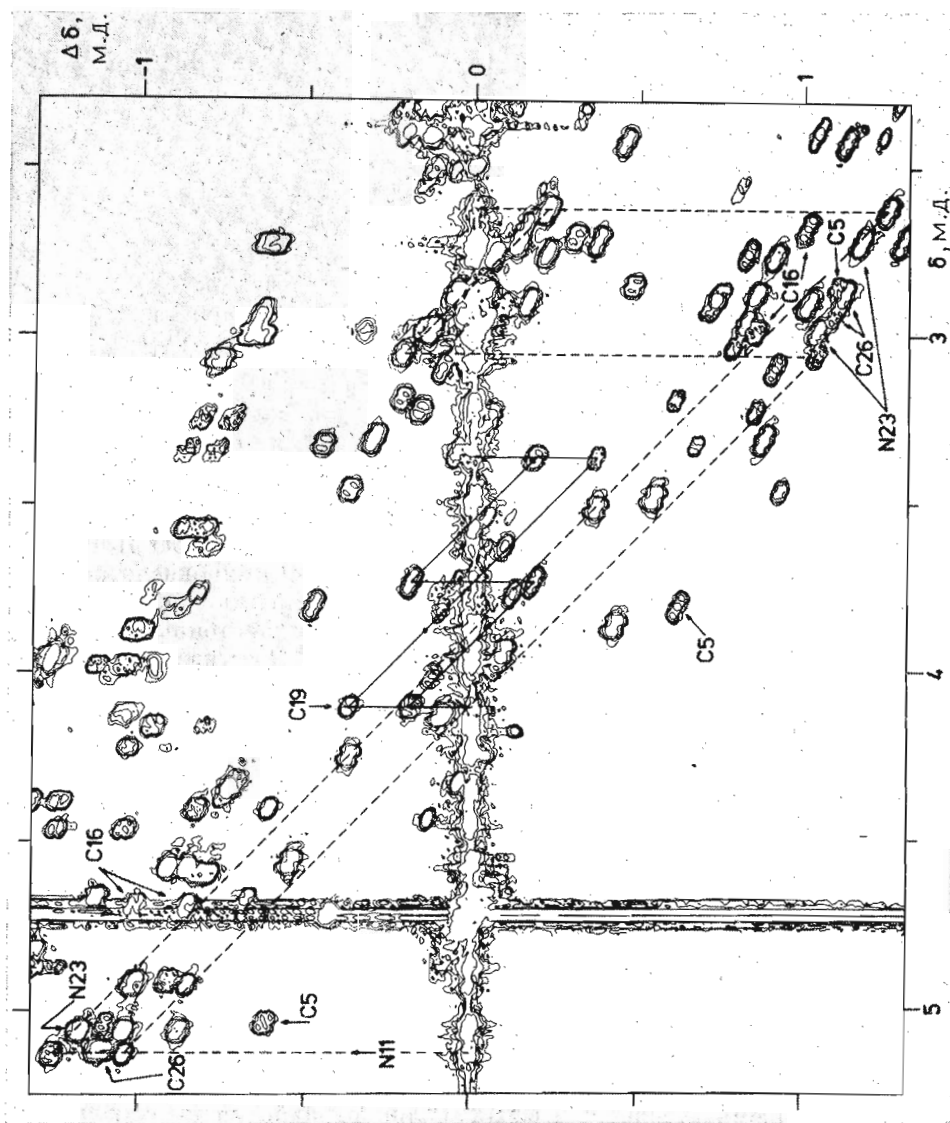


Рис. 7. Спектральная область δ 2,4–5,2 м. д. SECSY-спектра (фрагмент спектра рис. 2) инсектотоксина. Протон-протонные J -связи показаны для спинонов систем АВХ протонов $C^{\alpha}H-C^{\beta}H_2$ остатка Asp¹¹ (пунктир) и Cys¹⁹ (сплошные линии). Стрелками указаны кросс-пики остатков Cys⁵, Cys¹⁶, Cys²⁶ и Asp²³



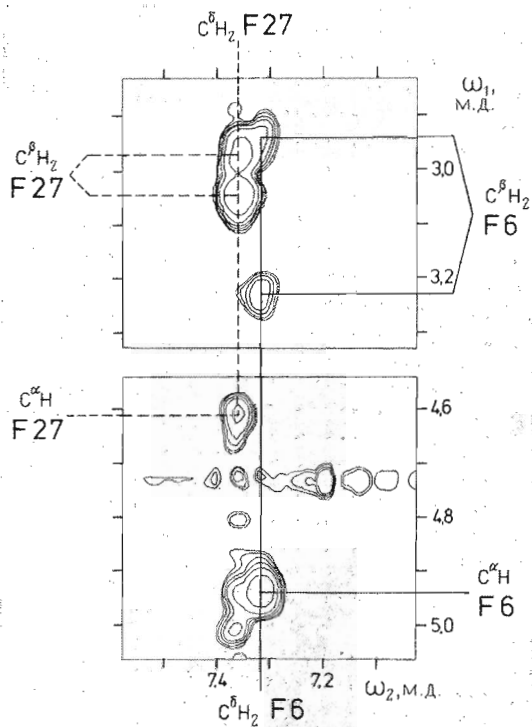


Рис. 8. Спектральная область ω_1 2,8–3,3 и 4,5–5,1 м. д., ω_2 7,0–7,6 м. д. NOESY-спектра инсектотоксина в $^2\text{H}_2\text{O}$ (30°C). Показано соотношение сигналов протонов $\text{C}^\delta\text{H}_2\text{-C}^\alpha\text{H}$ и кольцевых протонов остатков Phe⁶ и Phe²⁷

тоны C^αH двух остатков, например Phe²⁷ и Asn³⁴, имеют близкие химические сдвиги, то J -связь между протонами C^αH и NH в COSY-спектре (рис. 3) не дает однозначного отнесения. В подобных ситуациях отнесение протона NH дополнительно контролировалось с помощью ЯЭО между данным протоном NH и протонами C^βH внутри аминокислотного остатка. Изложенным способом перед отнесением сигналов к определенным остаткам аминокислотной последовательности протонные спиновые системы были полностью идентифицированы для 23 указанных выше остатков инсектотоксина. Для двух аминокислотных остатков, Ala¹³ и Leu³², поскольку они являются единственными остатками данного типа в молекуле, сигналы однозначно отнесены по характерным J -связям.

Отнесение аминокислотных остатков. Основная стратегия отнесения сигналов к конкретным аминокислотным остаткам вдоль полипептидной цепи подробно описана в работах [11–15]. Для этой цели используется ЯЭО протона N_{i+1}H $i+1$ -го остатка полипептидной цепи с протонами $\text{C}_i^\alpha\text{H}(d_1)$, $\text{N}_i\text{H}(d_2)$ и $\text{C}_i^\beta\text{H}(d_3)$ предыдущего i -го остатка (рис. 1). Рассмотрение конформационных возможностей полипептидного фрагмента (рис. 1) и статистический анализ известных по данным рентгеноструктурных исследований пространственных структур 19 белков показали высокую надежность использования d -связей (d_1 , d_2 и d_3) [12]. Если наблюдается только одна из этих d -связей, надежность отнесения составляет ~80%, в случае двух связей между соседними остатками надежность превышает 90% [12]. Кроме того, отнесение дополнительно проверяется во время следования вдоль полипептидной цепи, так как из аминокислотной последовательности известно, какой тип протонной спиновой системы аминокислотного остатка должен быть предыдущим и последующим.

В качестве подготовки к отнесению сигналов в инсектотоксине через d -связи нами были получены химические сдвиги сигналов от всех прото-

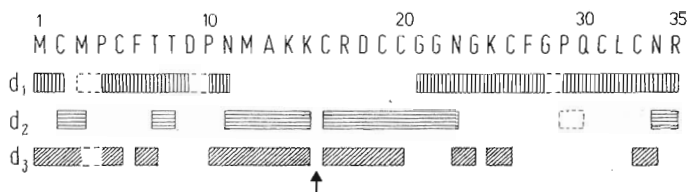


Рис. 9. Аминокислотная последовательность инсектотоксина I₅A *B. eupreus* и карта *d*-связей между остатками, на основании которых получено отнесение сигналов в ¹H-ЯМР-спектрах (табл. 1). Вертикально заштрихованные участки указывают на последовательное отнесение сигналов через *d*₁-связь, горизонтально заштрихованные — на существование *d*₂-связи. Наклонно заштрихованными участками отмечены *d*₃-связи. Участки, выделенные пунктирной линией, указывают на ЯЭО-связи протонов C^αH₂ остатков пролина с протонами предыдущих в аминокислотной последовательности остатков. Стрелка указывает участок полипептидной цепи для которого ни одна из *d*-связей не установлена, хотя сигналы соседних аминокислотных остатков (Lys¹³ и Cys¹⁶) полностью отнесены

нов остатков Leu³² и Ala¹³, а также сигналов выделенных спиновых систем остатков глицина, треонина и фенилаланина. Эти сигналы были использованы при анализе как стартовые. Если какая-либо одна из *d*-связей найдена, обязательно проверялись остальные две *d*-связи. Если по каким-либо причинам путь следования вдоль полипептидной цепи через *d*₁-, *d*₂- или *d*₃-связи обрывался или становился затрудненным, начинали от другого аминокислотного остатка с известным положением или выделенной спиновой системы. Первоначально отнесение сигналов в ЯМР-спектрах инсектотоксина основывалось на аминокислотной последовательности инсектотоксина I₅ *B. eupreus* [10]. Однако при анализе обнаружено, что данные спектроскопии ЯМР нельзя согласовать с аминокислотной последовательностью инсектотоксина I₅ в положениях 14, 23 и 24 (Asn¹⁴, Gly²³ и Lys²⁴ [10]). Полное согласие данных спектроскопии ЯМР может быть достигнуто, если предположить, что в положениях 14, 23 и 24 полипептидной цепи инсектотоксина находятся остатки лизина, аспарагина и глицина соответственно. Изучение аминокислотной последовательности инсектотоксина химическими методами (см. «Экспериментальную часть») полностью подтвердило данные спектроскопии ЯМР. Аминокислотная последовательность инсектотоксина, получившего индекс I₅A, приведена на рис. 9.

Таким образом, было получено практически полное отнесение сигналов в ¹H-ЯМР-спектрах (табл. 1), которое в большинстве случаев основано на двух *d*-связях — либо на *d*₁ и *d*₃, либо на *d*₂ и *d*₃ (рис. 9). Исключение составляют остатки Lys¹⁵ и Cys¹⁶, для которых *d*₁- и *d*₃-связи отсутствуют, а *d*₂-связь нельзя однозначно определить в NOESY-спектре, поскольку химические сдвиги сигналов амидных протонов близки между собой при использованных экспериментальных условиях (табл. 1).

В представленных на рис. 10–13 COSY-NOESY-диаграммах область NH-C^αH кросс-пиков NOESY-спектра скомбинирована с соответствующей областью COSY-спектра, полученных для одного образца при идентичных экспериментальных условиях. Такая диаграмма содержит в NOESY-спектре кросс-пики, соответствующие *d*₁-связям между протоном N_{i+1}H и протоном C_i^αH предыдущего по аминокислотной последовательности остатка, и в COSY-спектре кросс-пики, отвечающие *J*-связям между протонами NH и C^αH внутри одного и того же остатка. Если следовать вдоль полипептидной цепи в направлении от C-конца к N-концу, соединяя линиями, как показано на рис. 10–13, соответствующие COSY- и NOESY-кросс-пики, то они образуют спиральную ломаную линию, направленную по часовой стрелке.

Спектры, приведенные на рис. 10–12, получены при 30 и 50° С. Это было сделано по двум причинам. Во-первых, в ходе эксперимента сигнал от протонов воды селективно насыщается дополнительным радиочастотным полем (см. «Экспериментальную часть»). При этом могли насыщаться также сигналы протонов C^αH, имеющих близкие к воде значения хи-

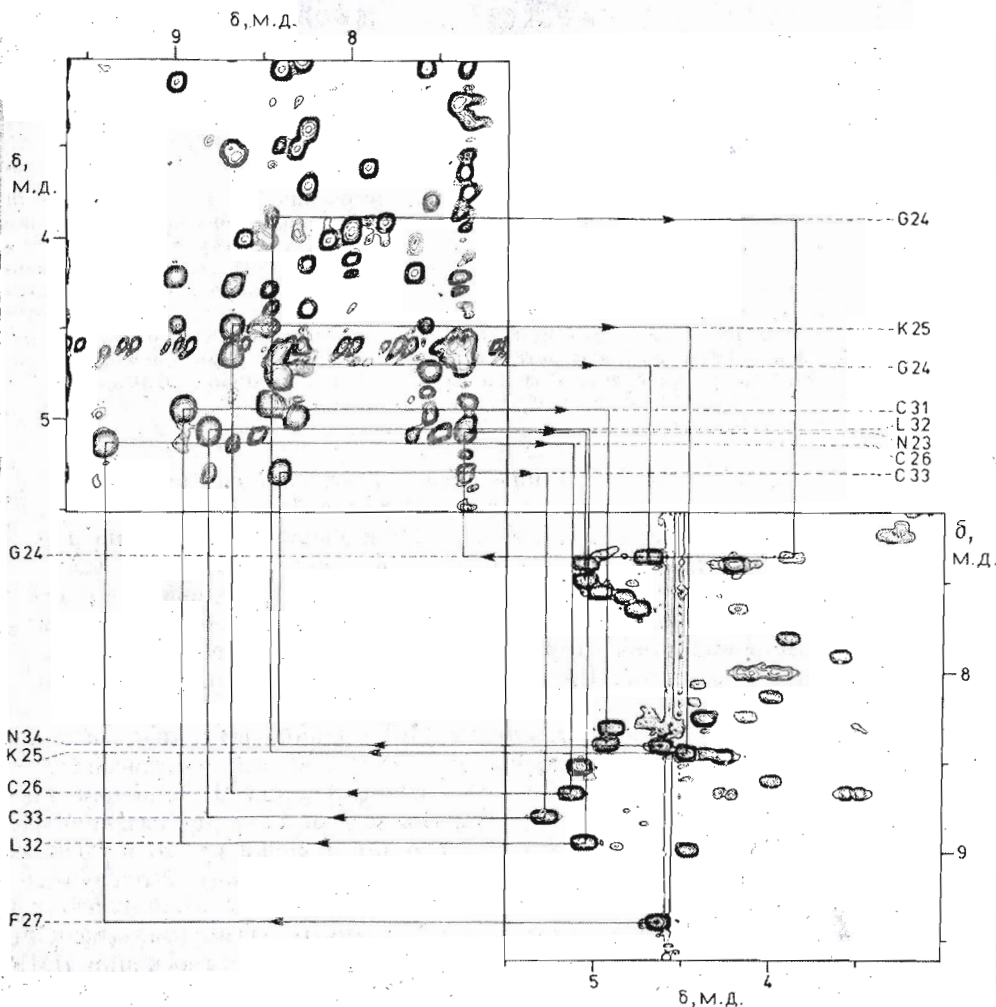


Рис. 10. Комбинированная COSY—NOESY-диаграмма для отнесения ^1H -сигналов при помощи ЯЭО между амидным протоном данного аминокислотного остатка и протоном C^αH предыдущего по аминокислотной последовательности остатка (d_1 -связь). В верхнем левом квадрате рисунка расположена область ω_1 3,1–5,5 м. д., ω_2 7,1–9,6 м. д. NOESY-спектра раствора инсектотоксина в H_2O при 50°C . В правом нижнем квадрате расположена область ω_1 7,1–9,6 м. д., ω_2 3,1–5,5 м. д. COSY-спектра, полученного для того же образца раствора инсектотоксина при идентичных экспериментальных условиях. Прямые линии со стрелками указывают d_1 -связи между соседними остатками в участках аминокислотной последовательности от Phe²⁷ до Asn²³ и от Asp³⁴ до Cys³¹. Отнесения химических сдвигов сигналов амидных протонов к аминокислотным остаткам инсектотоксина указаны в левом нижнем квадрате рисунка, а для протонов C^αH — в правом верхнем квадрате соответственно

мических сдвигов, что приводило к исчезновению соответствующих кросс-пиков в NOESY- и COSY-спектрах. Насыщение сигнала воды дает дополнительную вертикальную полосу в области химического сдвига сигнала воды (рис. 10–12), что в свою очередь мешает наблюдать кросс-пики, лежащие в данном спектральном диапазоне. Изменение температуры ведет к заметному изменению химического сдвига сигнала воды, и поэтому кросс-пики, отсутствующие при 30°C , хорошо проявляются при 50°C , и наоборот. Во-вторых, сигналы от амидных протонов имеют разные температурные коэффициенты химических сдвигов и поэтому изменение температуры позволяет избежать неоднозначности в отнесении их сигналов при совпадении химических сдвигов. Например, сигналы от протонов NH остатков Leu³² и Cys³³ совпадают по химическим сдвигам при 30°C (рис. 11), но достаточно хорошо различаются при 50°C

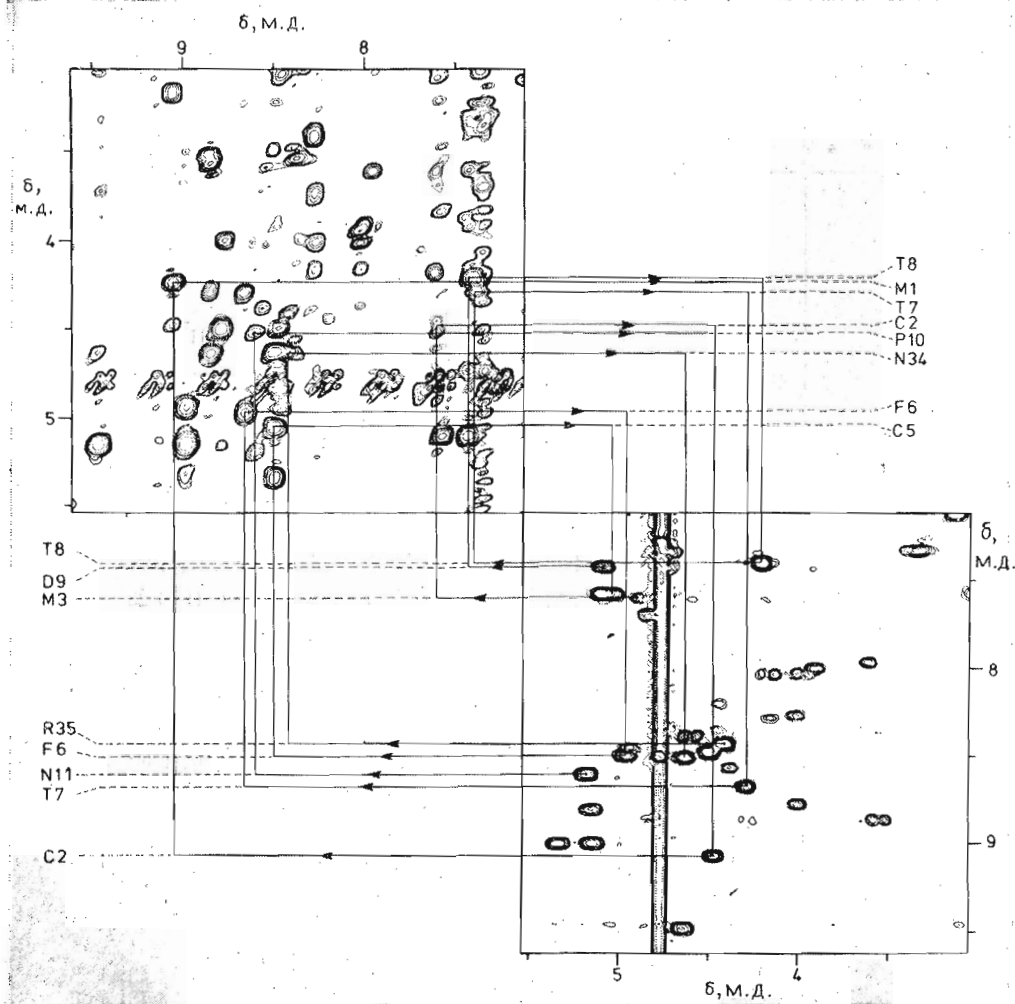


Рис. 11. Комбинированная COSY — NOESY-диаграмма для последовательного отнесения ^1H -сигналов с помощью ядерного эффекта Оверхаузера между протонами N_{i+1}H и $\text{C}^{\alpha}\text{H}$. В верхнем левом квадрате расположена область ω_1 3,05—5,55 м. д., ω_2 7,1—9,6 м. д. NOESY-спектра раствора инсектотоксина в H_2O (30°C). В правом нижнем квадрате расположена область ω_1 7,1—9,6 м. д., ω_2 3,05—5,55 м. д. COSY-спектра, полученного при идентичных экспериментальных условиях. Линии со стрелками указывают d_1 -связи между соседними остатками в участках аминокислотной последовательности от Met³ до Met⁴, от Asp⁹ до Cys⁵, от Asn¹¹ до Pro¹⁰ и от Arg³⁵ до Asn³⁴. Отнесение химических сдвигов амидных протонов к аминокислотным остаткам инсектотоксина показано в левом нижнем квадрате, а протонов $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ — в правом верхнем квадрате диаграммы

(рис. 10). С целью упрощения анализа перекрытых областей спектра были получены также COSY- и NOESY-спектры в $^2\text{H}_2\text{O}$ с частично обмененными на дейтерий амидными протонами (рис. 13).

Связи d_2 и d_3 , полученные при анализе NOESY-спектров, представлены на рис. 14 и 15. Связи d_2 соединяют расположенные на диагонали спектра сигналы амидных протонов соседних по аминокислотной последовательности остатков через кросс-пик ЯЭО (рис. 14).

Для определения d_3 -связей, показанных на рис. 15, используется также информация о химических сдвигах сигналов от протонов C^{β}H , полученная из SECSY- и COSY-спектров. Например, для фрагмента Cys²⁶-Lys²⁵ отнесение начинается с наблюдения кросс-пигов между протонами NH и C^{β}H внутри остатка Cys²⁶. После этого находим кросс-пики между протонами NH остатка Cys²⁶ и C^{β}H остатка Lys²⁵ и затем между протоном NH и протонами C^{β}H остатка Lys²⁵. При анализе d_3 -связей не-

Химические сдвиги (δ , м. д.) протонов инсектотоксина I₅A при pH 2,9 и 30° С

Аминокислотный остаток	NH	C α H	C β H	Другие протоны
Met ¹		4,23	2,38; 2,19	C ¹ H ₂ 2,51; 2,27 C ² H ₃ *
Cys ²	9,05	4,42	3,15; 2,75	
Met ³	7,58	4,88	2,41; 2,31	C ¹ H ₂ 2,22; 2,13 C ² H ₃ *
Pro ⁴		4,78	2,14; 1,21	C ¹ H ₂ 2,06; 1,99 C ² H ₂ 3,82; 3,63
Cys ⁵	7,55	5,05	3,82; 2,86	
Phe ⁶	8,46	4,94	3,23; 2,92	C ² H ₂ 7,33; 7,33 C ² H ₂ ** C ³ H**
Thr ⁷	8,64	4,26	4,34	C ¹ H ₃ 1,28
Thr ⁸	8,38	4,18	4,45	C ¹ H ₃ 1,23
Asp ⁹	7,41	5,07	3,32; 2,72	
Pro ¹⁰		4,48	2,40; 2,00	C ¹ H ₂ 2,09; 2,00 C ² H ₂ 4,14; 3,99
Asn ¹¹	8,58	5,14	3,06; 2,63	N ² H ₂ 7,91; 7,06
Met ¹²	7,60	4,17	2,57; 2,24	C ¹ H ₂ 2,99; 2,33 C ² H ₃ *
Ala ¹³	8,75	3,97	1,45	
Lys ¹⁴	8,98	3,89	1,89; 1,84	C ¹ H ₂ 1,45; 1,38 C ² H ₂ 1,88; 1,68 C ² H ₂ 2,96; 2,96 N ² H ₃ ⁺ 7,82
Lys ¹⁵	8,24	3,99	1,90; 1,73	C ¹ H ₂ 1,43; 1,43 C ² H ₂ 1,73; 1,66 C ² H ₂ 3,01; 3,01 N ² H ₃ ⁺ 7,55
Cys ¹⁶	8,35	4,70	3,00; 2,68	
Arg ¹⁷	7,95	3,59	1,97; 1,85	C ¹ H ₂ 1,82; 1,63 C ² H ₂ 3,36; 3,26 N ² H 7,31
Asp ¹⁸	8,54	4,36	2,90; 2,90	
Cys ¹⁹	8,27	4,11	3,75; 3,37	
Cys ²⁰	7,35	4,68	3,34; 2,43	
Gly ²¹	8,02	4,14; 3,95		
Gly ²²	8,36	4,57; 3,49		
Asn ²³	7,55	5,07	2,99; 2,73	N ² H ₂ 7,59; 6,89
Gly ²⁴	7,41	4,73; 3,87		
Lys ²⁵	8,46	4,47	1,69; 1,67	C ¹ H ₂ 1,18; 1,16 C ² H ₂ 1,54; 1,51 C ² H ₂ 2,74; 2,74 N ² H ₃ ⁺ 7,37
Cys ²⁶	8,78	5,13	2,96; 2,88	
Phe ²⁷	9,46	4,61	3,04; 2,97	C ² H ₂ 7,36; 7,36 C ² H ₂ ** C ³ H**
Gly ²⁸	8,83	4,26; 3,52		
Pro ²⁹		4,89	2,24; 2,24	C ¹ H ₂ 2,13; 1,85 C ² H ₂ 4,02; 3,77
Gln ³⁰	7,69	4,83	2,22; 1,91	C ¹ H ₂ 2,35; 2,35 N ² H ₂ 7,63; 7,09

Таблица 1 (продолжение)

Аминокислотный остаток	NH	C ^α H	C ^β H	Другие протоны
Cys ³¹	8,44	4,92	3,09; 2,92	
Leu ³²	8,98	5,16	1,97; 1,38	C ^γ H 1,72 C ^δ H ₃ 0,89; 0,65
Cys ³³	8,97	5,32	3,47; 2,72	
Asn ³⁴	8,47	4,59	2,88; 2,77	N ^δ H ₂ 7,54; 6,84
Arg ³⁵	8,38	4,39	1,95; 1,75	C ^γ H ₂ 1,55; 1,55 C ^δ H ₂ 3,08; 3,08 N ^ε H 7,09
C-конец				NH ₂ 7,54; 6,84

* Для сигналов протонов C^εH₂-групп остатков метионина, расположенных при 2,06; 2,14 и 2,37 м. д., отнесение не удалось провести.

**Сигналы от протонов C^εH₂ и C^ζH ароматических колец остатков Phe^{6,27} расположены в узком спектральном диапазоне от 7,27 до 7,36 м. д., поэтому на данном этапе анализа точные значения химических сдвигов этих протонов не удалось определить.

обходимо помнить, что кросс-пики ЯЭО между протонами NH и C^βH как внутри остатка, так и между соседними остатками могут значительно различаться по интенсивности из-за зависимости ЯЭО от расстояния d_3 . Например, амидный протон Cys²⁶ имеет малоинтенсивный кросс-пик с одним из протонов C^βH этого остатка (расположенным при 2,88 м.д.), интенсивный кросс-пик с другим протоном C^βH (2,96 м.д.) и кросс-пик средней интенсивности с протонами C^βH (1,67 м.д.) остатка Lys²⁵ (рис. 15).

Итог проведенного анализа представлен на фрагменте COSY-спектра инсектотоксина (рис. 3), где дано отнесение кросс-пигов протонов от всех фрагментов NH-C^αH к определенному аминокислотному остатку. Для трех остатков пролина химические сдвиги протонов C^αH отнесены через d_1 -связи (рис. 11, 13). Протоны C^βH остатков пролина отнесены через ЯЭО с протонами C^αH предшествующих по аминокислотной последовательности остатков (рис. 16). Тогда, зная химические сдвиги протонов C^αH и C^δH₂ каждого остатка пролина, можно в SECSY-спектре идентифицировать все J -связи внутри спиновой системы протонов каждого остатка пролина (см. рис. 2, 6, 17–19).

Отнесение сигналов от протонов боковых цепей аминокислотных остатков. Химические сдвиги сигналов от протонов боковых цепей остатков метионина, глутамина, аргинина и лизина получены при анализе J -связей в SECSY-спектрах (рис. 17–20, табл. 1).

В инсектотоксине имеются пять амидных групп NH₂ в боковых цепях трех остатков аспарагина, одного остатка глутамина и на С-конец пептидной цепи. Сигналы от протонов NH₂, принадлежащие к одной группе, идентифицированы с помощью ЯЭО между ними, наблюдаемого в NOESY-спектре.

Сигналы от амидных протонов NH₂ боковой цепи Gln³⁰ отнесены через ЯЭО с протонами C^γH₂. Аналогичным способом через ЯЭО с протонами C^βH₂ отнесены сигналы амидных протонов боковой цепи остатков Asn¹⁴ и Asn²³. ЯЭО не удалось наблюдать в NOESY-спектре между протонами C^βH₂ и N^δH₂ Asn³⁴, а также между протонами C^αH остатка Arg³⁵ и С-концевой амидной группы. Однако химические сдвиги сигналов от этих амидных групп NH₂ совпадают и поэтому в принципе не нуждаются в отнесении. Полное отнесение сигналов протонов амидных групп NH₂ в ¹H-ЯМР-спектрах инсектотоксина представлено в табл. 1.

Химические сдвиги сигналов от протонов N^εH остатка Arg¹⁷ и Arg³⁵ определены в COSY-спектре (рис. 3) через J -связи с протонами C^δH₂. Аналогичным образом отнесены сигналы от протонов ζN⁺H₃ боковой цепи остатков Lys¹⁴, Lys¹⁵ и Lys²⁵ в COSY-спектре при 30°С. При повышении температуры до 50°С скорость обмена протонов ζN⁺H₃ с раство-

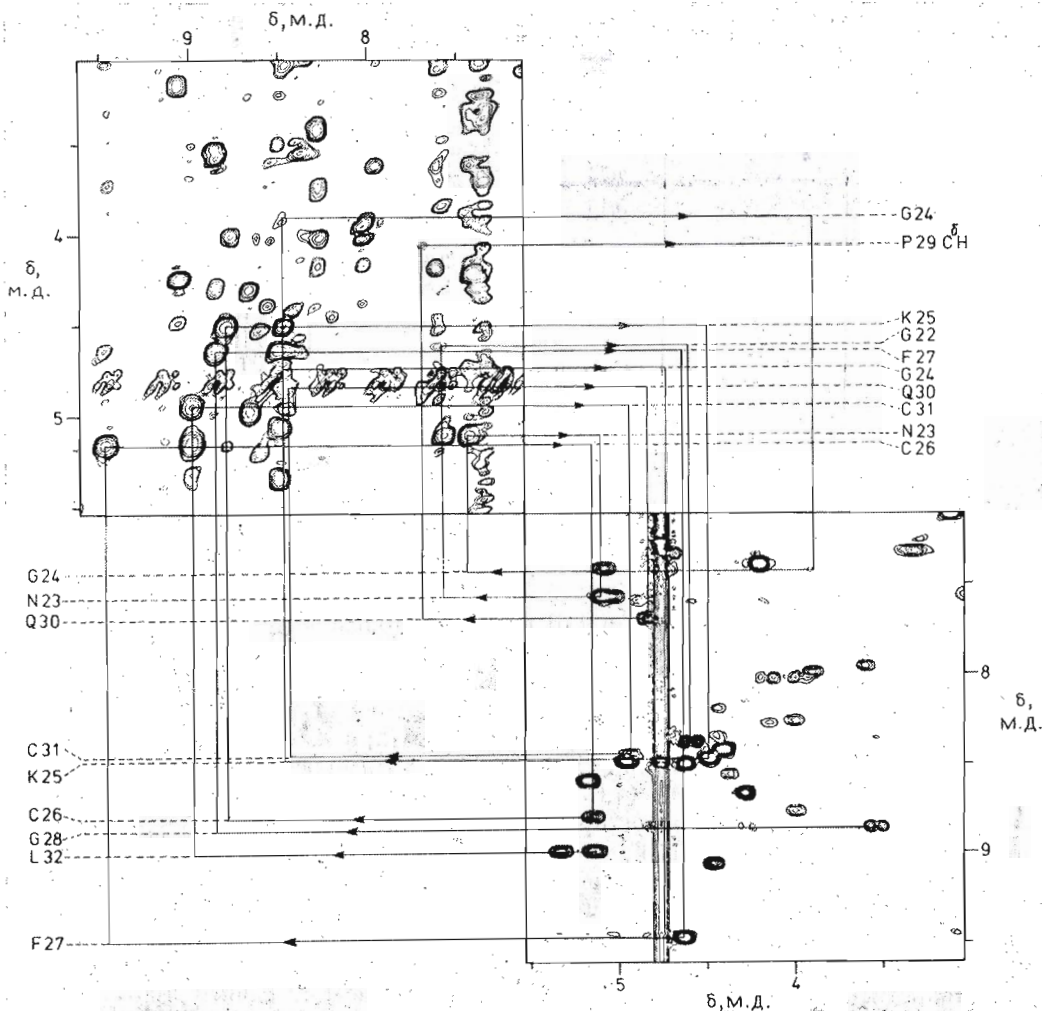


Рис. 12. Комбинированная COSY — NOESY-диаграмма для последовательного отнесения ^1H -сигналов с помощью ядерного эффекта Оверхаузера между протонами N_{i+1}H и C^iH . Представлены такие же спектральные области, как на рис. 11. Линии со стрелками указывают d_1 -связи между соседними остатками в участках аминокислотной последовательности от Gly²⁸ до Gly²² и от Leu³² до Gln³⁰. Кроме того, показана d_2 -связь между амидным протоном Gln³⁰ и протоном C^6H Pro²⁹. Отнесения химических сдвигов протонов NH и C^iH к определенным аминокислотным остаткам инсектотоксина указаны соответственно в левом нижнем и правом верхнем квадратах диаграммы

рителем возрастает и в COSY-спектре остается кросс-пик только Lys²⁵ (рис. 3).

Таким образом, использование двумерной спектроскопии SECSY, COSY и NOESY позволило провести практически полное отнесение сигналов протонов в спектрах ^1H -ЯМР инсектотоксина I, A *B. eupreus*. Остались неотнесенными сигналы протонов $\alpha\text{N}^+\text{H}$, N-концевой группы и протонов гуанидиновых групп аргининовых остатков, поскольку эти протоны быстро обмениваются с растворителем и их сигналы не наблюдаются в двумерных спектрах ^1H -ЯМР при выбранных нами экспериментальных условиях. Кроме того, не удалось отнести сигналы CH_3 -групп трех остатков метионина, расположенных при 2,06; 2,14 и 2,37 м.д. Константы спин-спинового взаимодействия через четыре химических связи между протонами C^iH_2 и C^{i+1}H_3 остатков метионина близки к нулю и в спектрах ЯМР не наблюдаются. Поэтому J -связи между этими протонами не были найдены в COSY- и SECSY-спектрах инсектотоксина. Кроме того, хими-

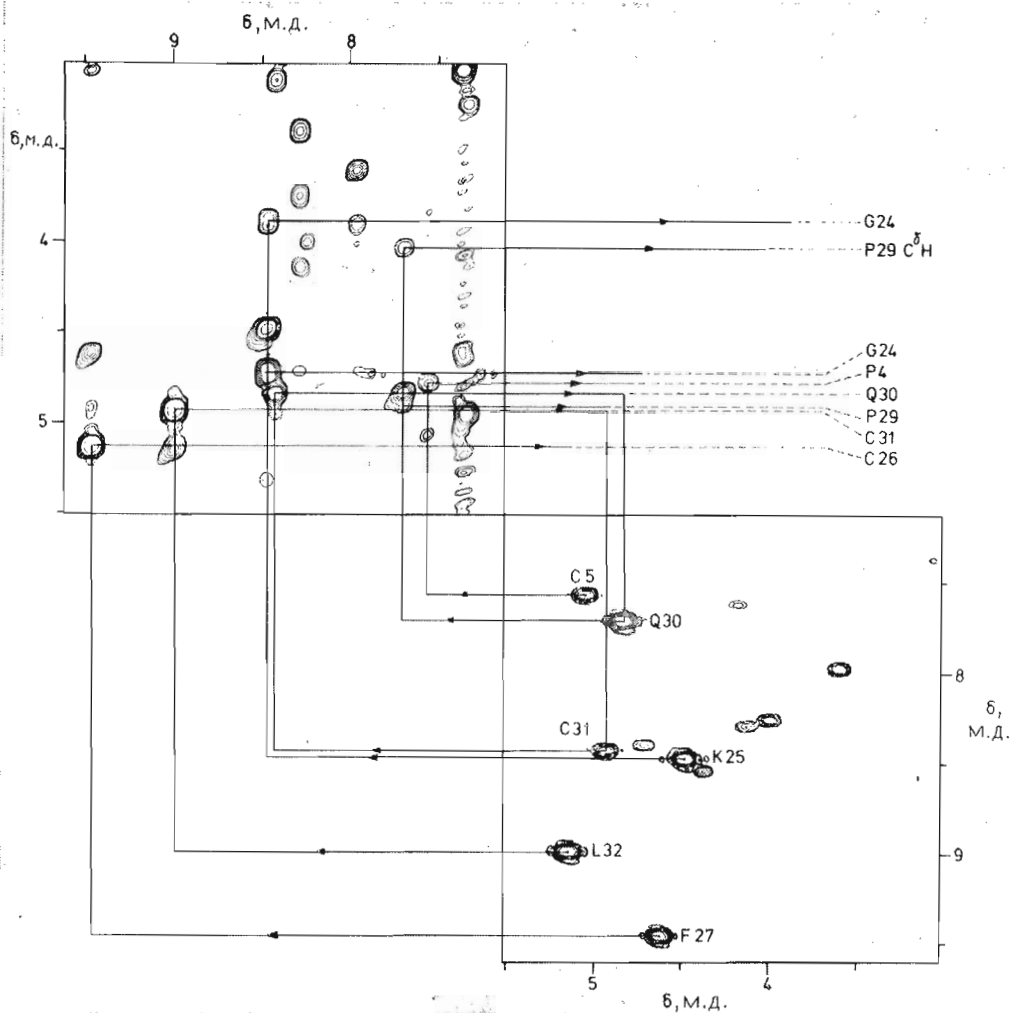


Рис. 13. Комбинированная COSY – NOESY-диаграмма отнесения ^1H -сигналов при помощи ЯЭО между протонами N_{i+1}H и $\text{C}_i^\alpha\text{H}$. В верхнем левом квадрате расположена область ω_1 3,0–5,5 м. д., ω_2 7,1–9,6 м. д. NOESY-спектра раствора инсектотоксина в $^2\text{H}_2\text{O}$ (30°C). В правом нижнем квадрате расположена область ω_1 7,1–9,6 м. д., ω_2 3,0–5,5 м. д. COSY-спектра, полученного для того же образца и при идентичных условиях с интервалом 24 ч после NOESY-спектра. Прямые линии со стрелками указывают d_1 -связи между соседними остатками Cys⁵ и Pro⁴, Lys²⁵ и Gly²⁴, Phe²⁷ и Cys²⁶ и в цепи Leu³² – Pro²⁹. Отнесения химических сдвигов амидных протонов к аминокислотным остаткам инсектотоксина указаны в левом нижнем квадрате диаграммы, а для протонов C^αH – в правом верхнем квадрате соответственно

ческие сдвиги протонов C^1H_2 и C^6H_3 близки между собой (табл. 1). Соответствующие кросс-пики ЯЭО близки к диагонали и трудно интерпретируемы в NOESY-спектре.

Вторичная структура молекулы инсектотоксина. Следующей задачей является определение пространственной структуры молекулы инсектотоксина. Для этого необходимо провести полный анализ NOESY-спектров, измерить константы спин-спинового взаимодействия протонов, определить участвующие во внутримолекулярных водородных связях протоны NH и т. д. Однако уже сейчас приведенные данные о d_1 -, d_2 - и d_3 -связях между аминокислотными остатками позволяют сделать выводы о вторичной структуре молекулы инсектотоксина в растворе (*цис*- или *транс*-конфигурация пептидной связи, наличие участков α -спирали, β -структуры и β -изгибов).

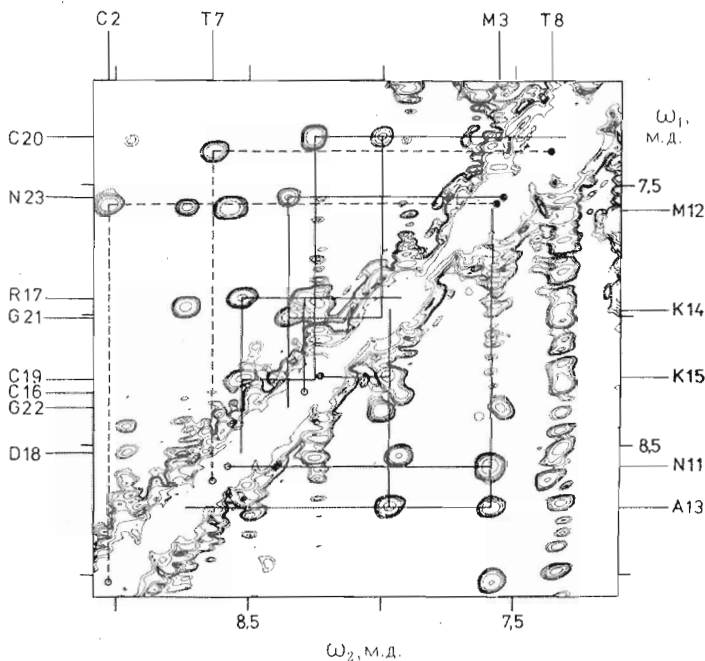


Рис. 14. Область δ 7,1–9,1 м. д. NOESY-спектра раствора инсектотоксина в H_2O (30°C). ЯЭО между амидными протонами соседних остатков показаны сплошными и пунктирными линиями. Химические сдвиги и отнесение сигналов протонов NH указаны на полях контурной карты. Кружки на диагонали обозначают начало и конец участков полипептидной цепи, в которых наблюдаются d_2 -связи. В верхнем левом углу контурной карты показаны d_2 -связи между Cys² и Met³, Thr⁷ и Thr⁸ и на участке от Cys¹⁶ до Asp²³. В правом нижнем углу показаны d_2 -связи в полипептидном фрагменте Asn¹¹ – Lys¹⁵

Инсектотоксин содержит три остатка пролина в положениях 4, 10 и 29. На рис. 21 показана зависимость расстояний между протоном C^αH i -го остатка, предшествующего пролину в аминокислотной последовательности, и протонами $\text{C}^\delta\text{H}_2$ и C^αH $i+1$ -го остатка пролина от угла ψ_i i -го остатка для *цис*- и *транс*-конфигурации пептидной связи X-Pro. В условиях NOESY-эксперимента (время смешивания компонентов намагниченности 100 мс) наблюдаются кросс-пики только между протонами, расстояние между которыми не превышает 3,0–3,5 Å. Например, в ряде случаев наблюдаются кросс-пики низкой интенсивности в NOESY-спектрах между протонами NH- C^αH пептидного фрагмента основной цепи, максимальное расстояние для которых равно 2,93 Å. Следовательно, для *цис*-конфигурации X-Pro пептидной связи можно наблюдать ЯЭО в ^1H -NOESY-спектре между протоном C^αH i -го остатка и протоном C^αH (но не протонами $\text{C}^\delta\text{H}_2$) $i+1$ -го остатка пролина. Напротив, для *транс*-конфигурации пептидной связи X-Pro при определенных значениях угла ψ_i будет наблюдаться ЯЭО между протонами C^αH i -го остатка и протонами $\text{C}^\delta\text{H}_2$ (но не C^αH) $i+1$ -го остатка пролина (рис. 21).

В инсектотоксине для всех трех пролинов наблюдается ЯЭО между протонами $\text{C}^\delta\text{H}_2$ пролина и протоном C^αH предшествующего в аминокислотной последовательности остатка (рис. 16). Это означает, что в инсектотоксине реализуется только *транс*-конфигурация пептидной связи X-Pro.

В табл. 2 приведены рассчитанные (см. «Экспериментальную часть») значения d_1 , d_2 и d_3 для α -спирали и параллельной или антипараллельной β -структуры. Учитывая, что в условиях эксперимента в NOESY-спектрах наблюдались кросс-пики между сигналами от протонов, расстояние между которыми не превышает 3,0–3,5 Å, из табл. 2 можно сделать следующие выводы: для α -спиральных участков обязательно нали-

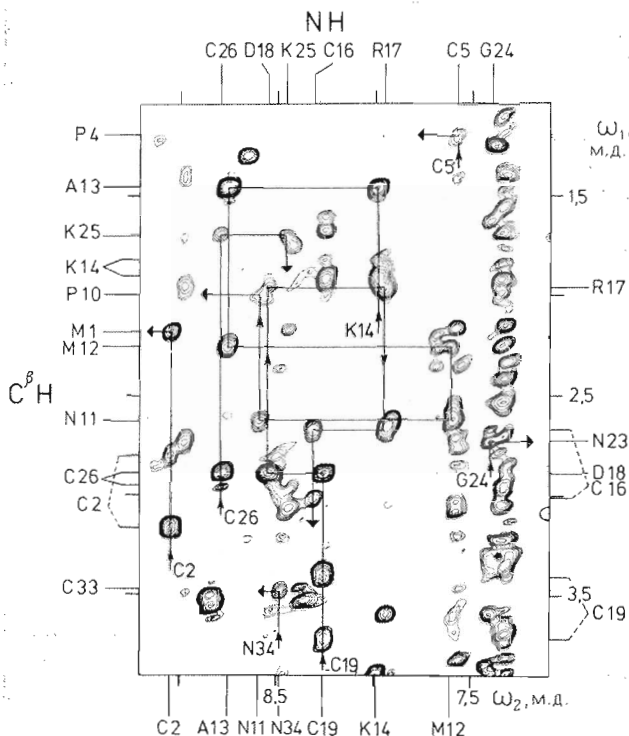


Рис. 15. Область ω_1 1,1–3,9 м. д., ω_2 7,1–9,2 м. д. NOESY-спектра (фрагмент спектра рис. 4). Линии со стрелками показывают последовательное отнесение сигналов, полученное ЯЭО между протонами $N_{i+1}H$ и $C_i^{\beta}H$ для участков полипептидной цепи Cys²-Met¹, Cys⁵-Pro⁴, Lys¹⁴ – Pro¹⁰, Cys¹⁹ – Cys¹⁶, Gly²⁴-Asn²³, Cys²⁶-Lys²⁵, Asn³⁴-Cys³³. Стрелка и темный треугольник указывают соответственно начало и конец участка аминокислотной последовательности, соединенных d_3 -связями. На верхнем и нижнем полях указаны положения отнесенных сигналов амидных протонов в шкале химических сдвигов. На левом и правом полях указано отнесение сигналов протонов $C^{\beta}H$

чие d_2 -связи и отсутствие d_1 -связи (исключением является остаток глицина). Напротив, для антипараллельной или параллельной β -структуры обязательно наличие d_1 -связи и отсутствие d_2 -связи. Связи d_3 могут наблюдаться в случае α -спирали или антипараллельной β -структуры, но отсутствуют в случае параллельной β -структуры.

Таблица 2

Характерные значения расстояний d_1 , d_2 и d_3 (Å) для правой α -спирали (α_R), антипараллельной β -структуры (β_A) и параллельной β -структуры (β_P)

Расстояние	α_R	β_A	β_P
d_1	3,49–3,56 *	2,21–2,38	2,21–2,28
d_2	2,42–3,25	3,93–4,51	3,80–4,54
d_3	2,11–4,11	2,73–4,41	3,22–4,55

* Для глицинового остатка значения d_1 для α -спирали равны 2,58–3,05 Å.

Для пептидного фрагмента от остатка Asp¹¹ до Gly²¹ во всех случаях, за исключением участка Cys¹⁶-Lys¹⁵*, характерно наличие d_2 - и d_3 -связей и отсутствие d_1 -связей. Это позволяет предположить существование α -

* Химические сдвиги сигналов протонов NH остатков Cys¹⁶ и Lys¹⁵ близки между собой (табл. 1), поэтому кросс-пик, соответствующий d_2 -связи, близок к диагонали и не может быть выделен в NOESY-спектре.

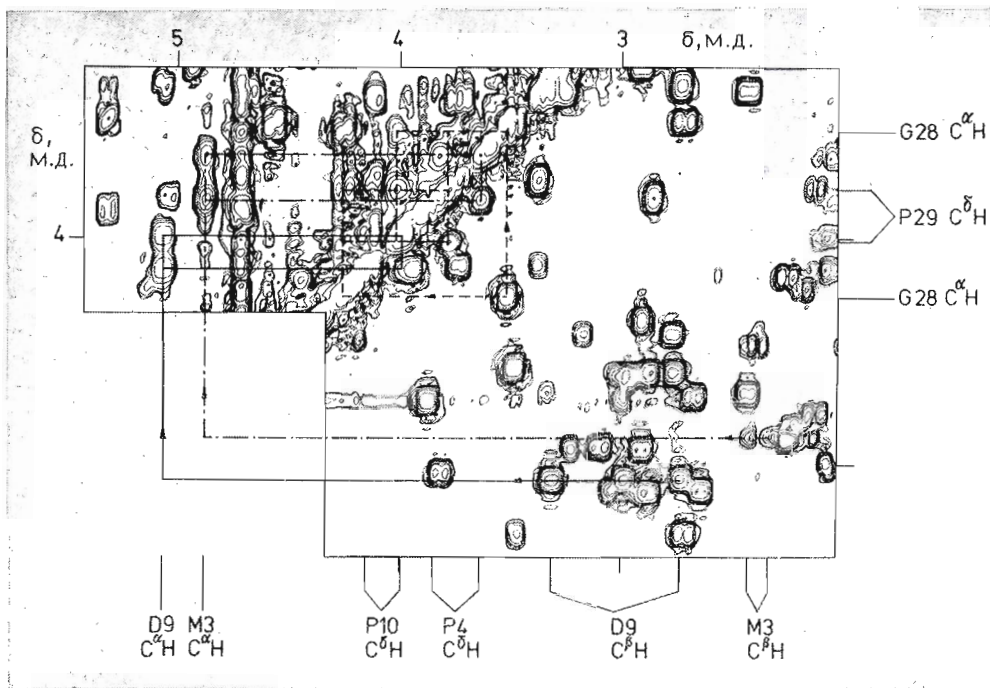


Рис. 16. Комбинированная диаграмма областей ω_1 3,3–5,4 м.д., ω_2 2,0–5,4 м.д. спектров раствора инсектотоксина в $^2\text{H}_2\text{O}$ (30°C). Линии со стрелками показывают отнесение сигналов, полученное посредством ЯЭО между протонами $\text{C}_{i+1}^{\delta} \text{H}_2$ остатков пролина и протоном $\text{C}_i^{\alpha} \text{H}$ для участков полипептидной цепи инсектотоксина: Met³-Pro⁴ (штрих-пунктир), Asp⁹-Pro¹⁰ (сплошная линия) и Gly²⁸-Pro²⁹ (пунктир). Химические сдвиги протонов $\text{C}^{\alpha} \text{H}$ Gly²⁸ и Pro²⁹ указаны на полях диаграммы справа, протонов $\text{C}^{\alpha} \text{H}$ и $\text{C}^{\beta} \text{H}$ Met³, Asp⁹ и протонов $\text{C}^{\delta} \text{H}_2$ Pro⁴, ¹⁰ – на полях внизу диаграммы. Отнесение начинается от *J*-кросс-пиков в COSY-спектре между протонами $\text{C}^{\alpha} \text{H}$ и $\text{C}^{\beta} \text{H}_2$ предшествующего пролину аминокислотного остатка. Следуя вдоль прямых, указанных стрелками, приходим к кросс-пикам ЯЭО в NOESY-спектре между протоном $\text{C}_i^{\alpha} \text{H}$ и протонами $\text{C}^{\delta} \text{H}_2$ *i*+1 остатка пролина. Отнесение заканчивается *J*-кросс-пиком в COSY-спектре между протонами $\text{C}^{\delta} \text{H}$ соответствующего остатка пролина

спирального участка, включающего в себя остатки от Asn¹⁴ до Gly²¹. Обращают на себя внимание еще два участка регулярной структуры, для которых характерно наличие d_1 -связей: Asn²³-Phe²⁷ и Gln³⁰-Asn³⁴. Принимая во внимание данные табл. 2, можно предположить, что указанные участки молекулы инсектотоксина находятся в β -структурной конфигурации. Поскольку эти фрагменты близки по аминокислотной последовательности, можно допустить, что в молекуле реализуется антипараллельная β -структура (остатки Asn²³-Phe²⁷ и Gln³⁰-Asn³⁴) с β -изгибом, образованным остатками Phe²⁷-Gly²⁸-Pro²⁹-Gln³⁰ (рис. 22).

Экспериментальная часть

Выделение инсектотоксина I₅A, карбоксиметилирование, термолитический гидролиз, а также разделение пептидов проводили как описано в работе [10]. Структуру термолитического пептида Th-3 токсина I₅A устанавливали методом Эдмана по методикам [24, 25]. В дансильном варианте использовали идентификацию амидов дикарбоновых кислот и самих кислот в виде Pth-производных. С-Концевую последовательность пептида Th-3 (Ala¹³-Cys²⁶) определяли при помощи карбоксипептидаз А и В при pH 6. Последующий анализ отщепленных аминокислот проводили на аминокислотном анализаторе, а также идентификацией Dns-производных аминокислот.

Двумерные ЯМР-спектры SECSY, COSY и NOESY получены на спектрометре с рабочей частотой 500 МГц типа Bruker WM-500, осна-

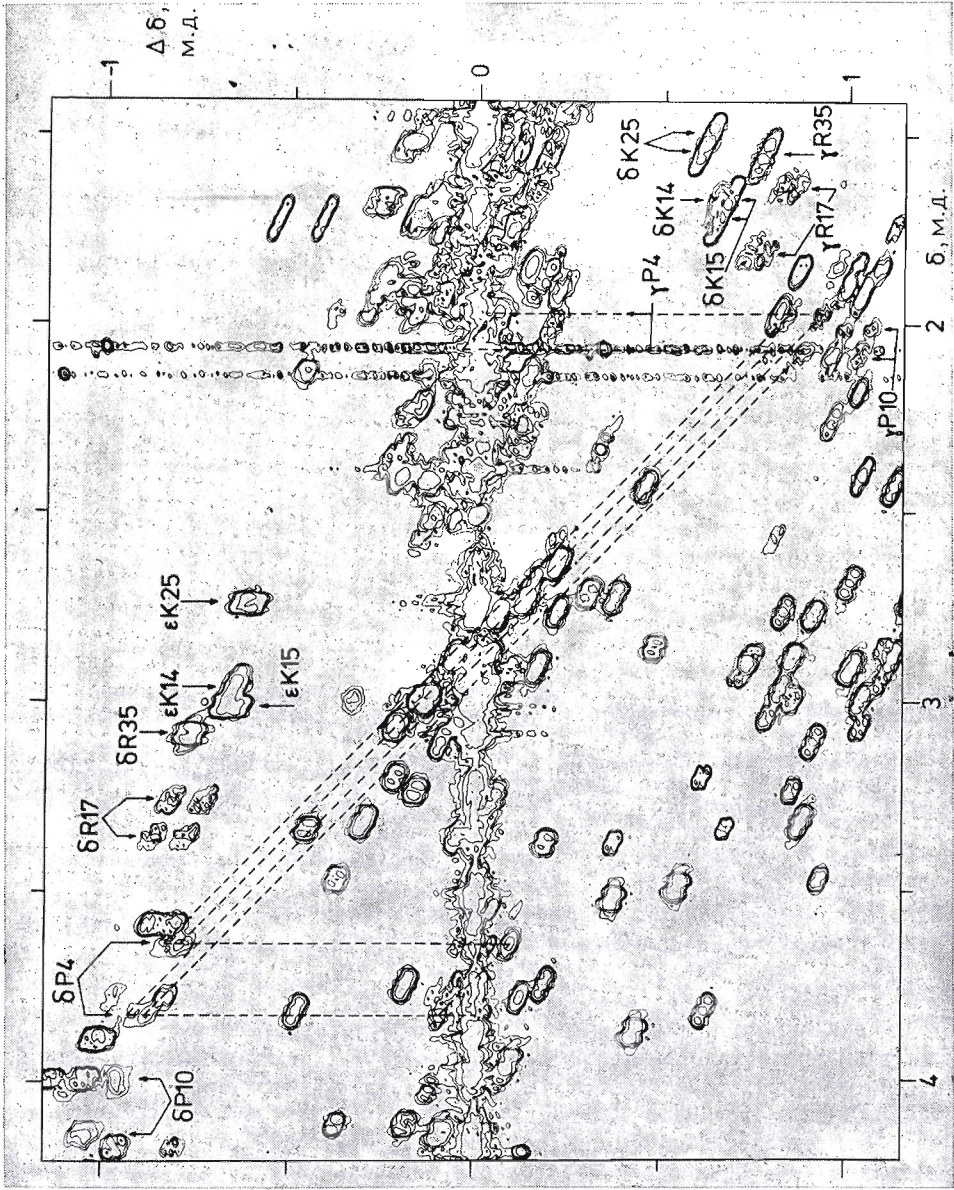


Рис. 17. Спектральная область δ 1,4–4,2 м.д. SECSY-спектра инсектотоксина (фрагмент спектра рис. 2). Протон-протонные J -связи показаны для спиновой системы $C^2H_2-C^1H_2$ P_{10}^4 (пунктир). Стрелками указаны кросс-пики протонов $C^2H_2-C^1H_2$ остатков P_{10}^4 , аргинина и кросс-пики протонов $C^2H_2-C^1H_2$ остатков лизина

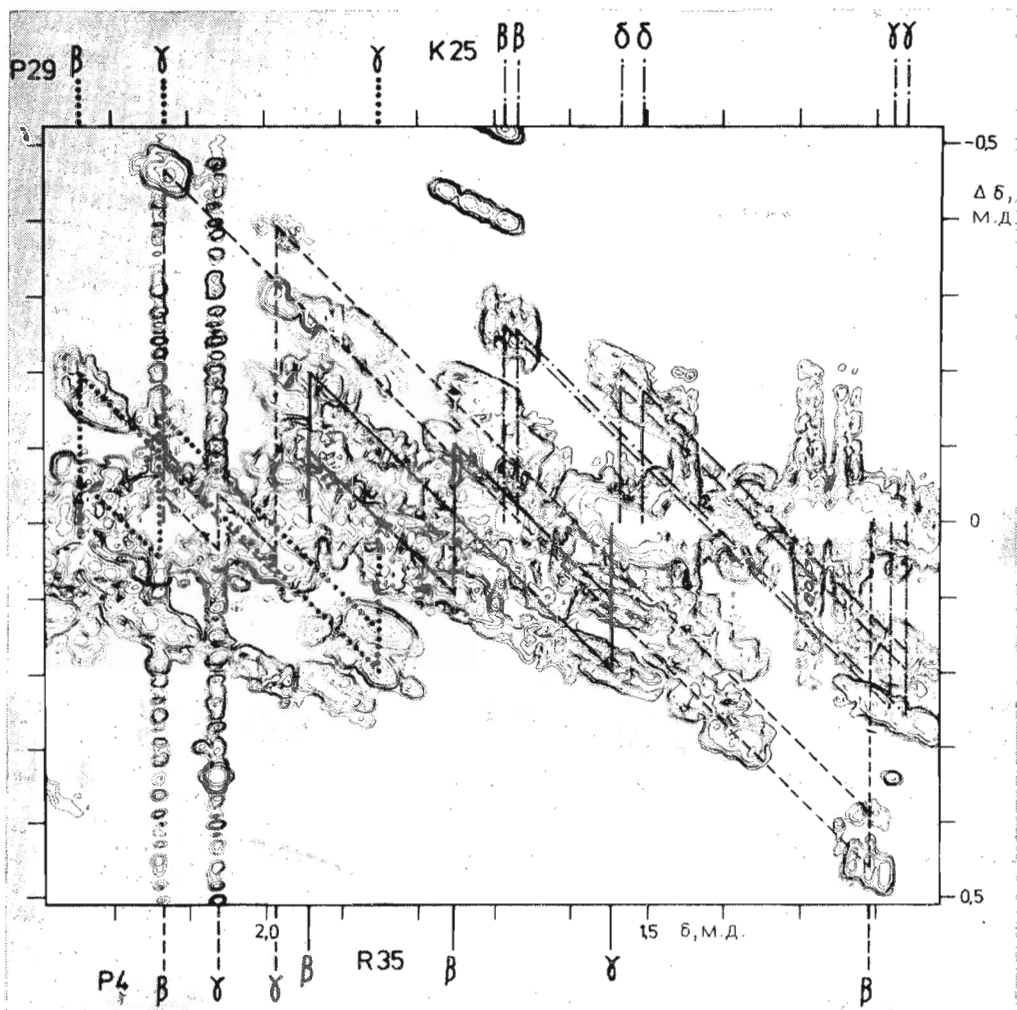


Рис. 18. Спектральная область δ 1,1–2,3 м.д. SECSY-спектра (фрагмент спектра рис. 2) инсектотоксина. Протон-протонные J -связи показаны для спиновых систем $C^6H_2-C^1H_2$ Pro⁴ (пунктир), Pro²⁹ (точки), Arg³⁵ (сплошная линия) и спиновой системы протонов $C^6H_2-C^1H_2-C^6H_2$ Lys²³ (штрих-пунктир). Химические сдвиги и отношение сигналов соответствующих протонов указаны на нижнем и верхнем полях диаграммы

щепного ЭВМ Aspect 2000. Спектры 0,011 М растворов инсектотоксина в 2H_2O и H_2O снимали в 5-мм ампуле при рН 2,9 и температурах 30 и 50°С. Три типа экспериментов, использованные для отнесения сигналов в 1H -ЯМР-спектрах инсектотоксина, подробно описаны в работах [19, 26–30].

COSY-спектры получены с помощью последовательности из двух не-селективных 90-градусных импульсов [19, 27, 30]:

$$(90^\circ - t_1 - 90^\circ - t_2)_n, \tag{I}$$

где t_1 и t_2 — периоды эволюции и наблюдения сигнала соответственно. Для получения COSY-спектра измерения были повторены для набора эквидистантных значений t_1 . Для улучшения соотношения сигнал-шум эксперимент повторялся n раз для каждого значения t_1 . COSY-спектры получены для 512 значений t_1 , лежащих в диапазоне 0,1–51,2 мс с шагом 0,1 мс.

Для получения SECSY-спектров использовалась импульсная последовательность [20, 27]:

$$\left(90^\circ - \frac{t_1}{2} - 90^\circ - \frac{t_1}{2} - t_2\right)_n. \tag{II}$$

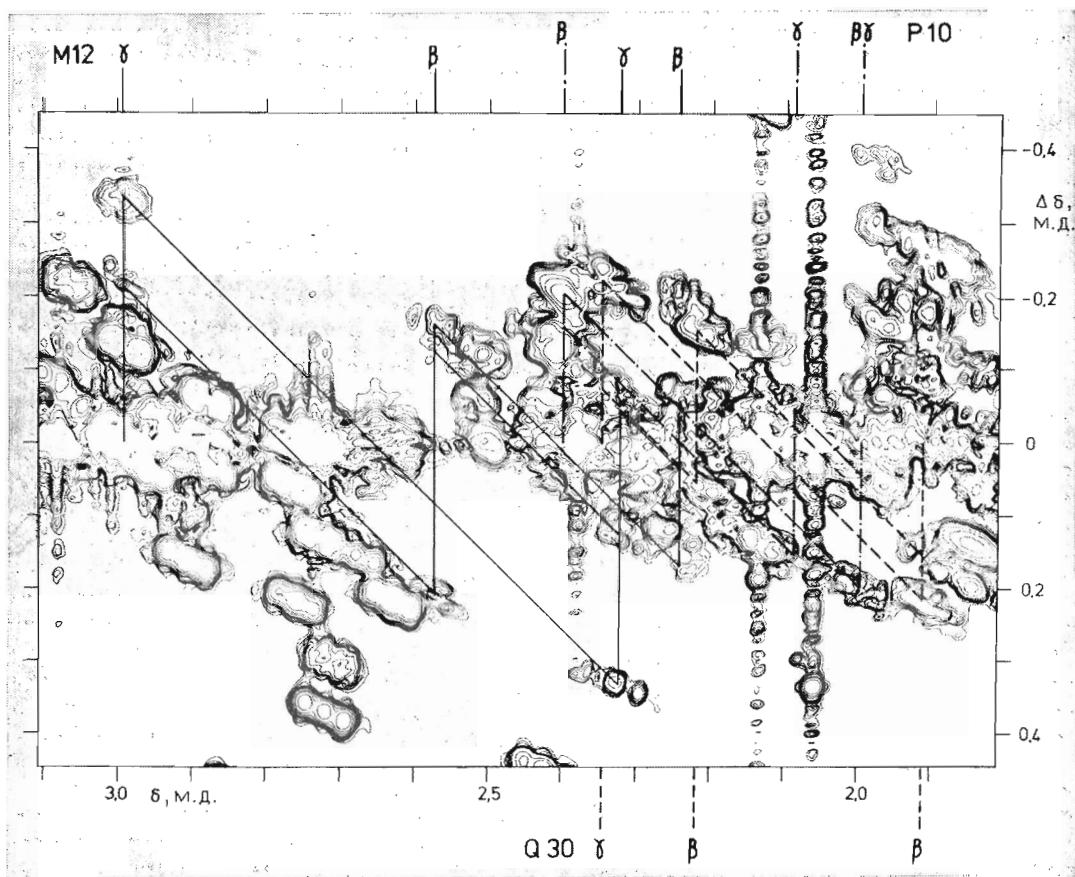


Рис. 19. Спектральная область δ 1,8–3,1 м.д. SECSY-спектра (фрагмент спектра рис. 2) инсектотоксина. Протон-протонные J -связи показаны для спиновых систем $C^{\beta}H_2-C^{\alpha}H_2$ Met¹² (сплошная линия), P10¹⁰ (штрих-пунктир) и Gln³⁰ (пунктир). Химические сдвиги и отнесение сигналов соответствующих протонов указаны на нижнем и верхнем полях диаграммы.

Параметры накопления SECSY-спектров брали как для COSY, за исключением того, что время t_1 варьировалось в пределах 0,1–204,9 мс с шагом 0,2 мс.

NOESY-спектры получали, используя трехимпульсную последовательность [28, 29]:

$$(90^\circ - t_1 - 90^\circ - \tau_M - 90^\circ - t_2)_n, \quad (\text{III})$$

где τ_M — время смешивания компонентов намагниченностей. Время τ_M составляло 100 мс, т. е. выбиралось достаточно коротким для предотвращения возможных эффектов спиновой диффузии [31]. Остальные параметры накопления NOESY-спектров аналогичны соответствующим параметрам COSY-спектров.

В каждом эксперименте после окончания времени t_2 перед началом следующей серии импульсов следовал временной интервал в 1,2 с для достижения равновесного состояния ядерной намагниченности. Во всех экспериментах использовалось квадратурное детектирование. При накоплении спектров каждая из приведенных выше импульсных последовательностей (I–III) повторялась 16 раз с различными фазами неселективных 90° -градусных импульсов, как описано в работах [20, 27]. Для уменьшения динамического диапазона спектров сигнал растворителя (H_2O) насыщали селективным радиочастотным импульсом в течение всего эксперимента, за исключением времени наблюдения сигнала t_2 [26].

Для COSY- и NOESY-спектров в результате преобразований Фурье получали матрицу данных 1024×1024 точек, которая соответствовала

Рис. 20. Спектральная область δ 1.2–2.6 м. д. SECSY-спектра (фрагмент спектра рис. 2) инсектотоксина. Протон-протонные J -связи показаны для спиновых систем $\text{C}^3\text{H}_2\text{-C}^7\text{H}_2$ Met¹ (сплошная линия), Met³ (точки), Arg¹⁷ (пунктир) и для протонов спиновой системы $\text{C}^8\text{H}_2\text{-C}^9\text{H}_2\text{-C}^{10}\text{H}_2$ Lys¹⁴ (сплошная линия) и Lys¹⁵ (точки). Химические сдвиги и относительные сигналы соответствующих протонов указаны на нижнем и верхнем полях диаграммы

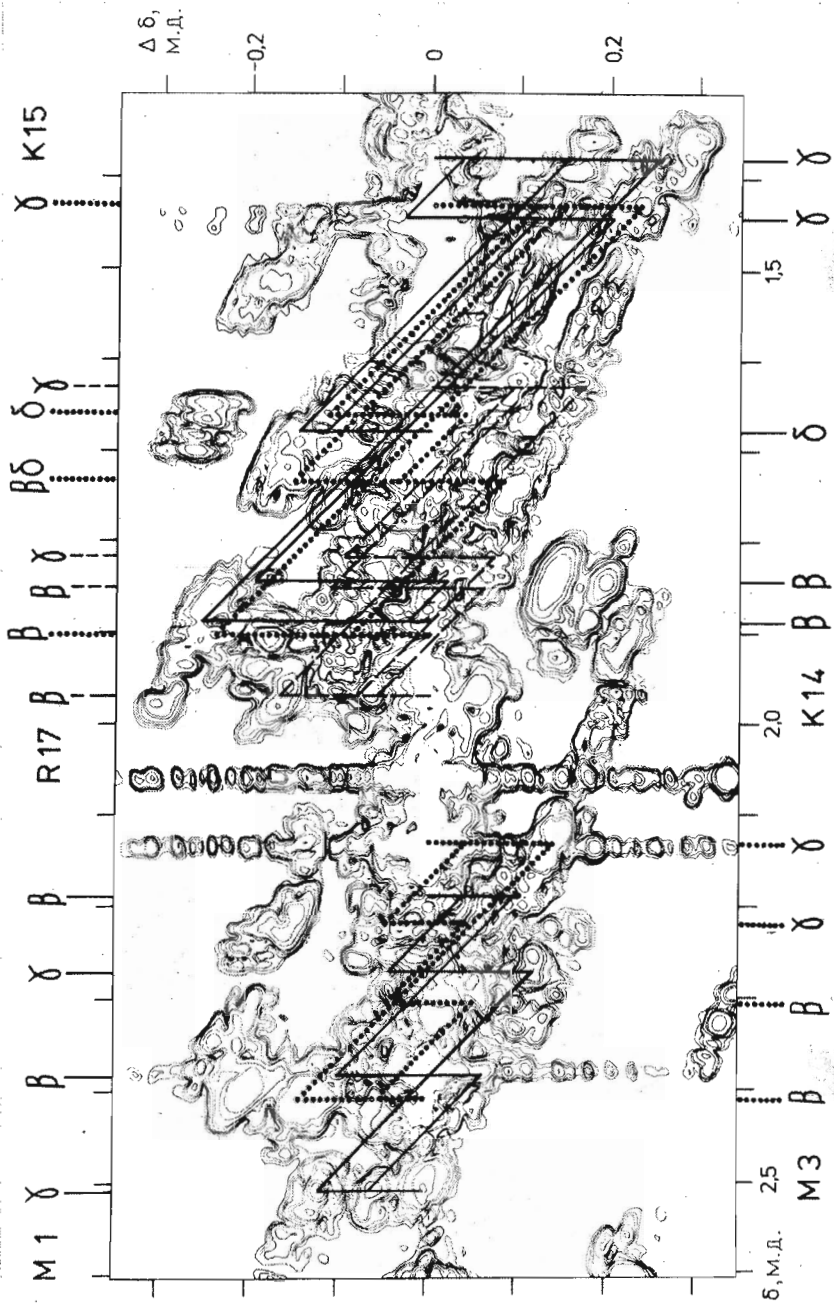
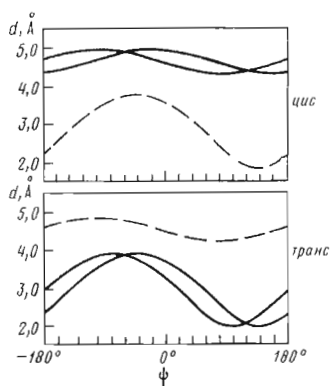


Рис. 21. Зависимость расстояний d между протоном $C^\alpha H$ i -го остатка, предшествующего пролину в аминокислотной последовательности и протонами $C^\delta H_2$ (сплошная линия) и $C^\alpha H$ (*увукитр*) $i+1$ -го остатка пролина от торсионного угла ψ_i i -го остатка для *цис*- и *транс*-конфигурации пептидной связи X-Pro



спектральному разрешению 4,9 Гц на точку. Для этого матрица данных во временной области дополнялась нулями до 2048 точек для времени t_1 и до 4096 точек для времени t_2 (для каждого COSY- и NOESY-спектров). Для SECSY-спектра матрица данных во временной области также дополнялась нулями до размера 2048×4096 точек, но спектральное разрешение при этом составляло 1,2 и 2,4 Гц на точку для ω_1 и ω_2 соответственно. Перед преобразованием Фурье матрицу данных во временной области умножали на следующие функции, уменьшающие полуширину сигналов в спектре:

$$\begin{aligned} & \sin[\pi(t_1+t_{01})/t_{s1}] \text{ для } t_1\text{-направления,} \\ & \sin^2[\pi(t_2+t_{02})/t_{s2}] \text{ для } t_2\text{-направления.} \end{aligned}$$

Значения t_{s1} или t_{s2} выбирали таким образом, чтобы соответствующая функция принимала нулевое значение для последних экспериментальных точек в t_1 - или t_2 -направлениях. Фазовые сдвиги функций t_{01}/t_{s1} и t_{02}/t_{s2} были равны соответственно $1/64$ и $1/16$ для t_1 - и t_2 -направлений.

Химические сдвиги сигналов в спектрах 1H -ЯМР измерены относительно внутреннего стандарта натревой соли 3-триметилсилил-[2, 2, 3, 3- 2H] пропионата с точностью $\pm 0,01$ м. д. Для измерения pH водных растворов инсектотоксина использовали pH-метр типа Orion Research 601 с комбинированным электродом Ingold 405 МЗ. Поправку на изотопный эффект в растворах 2H_2O не вводили.

Зависимость расстояний между протоном $C^\alpha H$ i -го аминокислотного остатка и протонами $C^\alpha H$ и $C^\delta H_2$ $i+1$ -го остатка пролина от угла ψ_i i -го

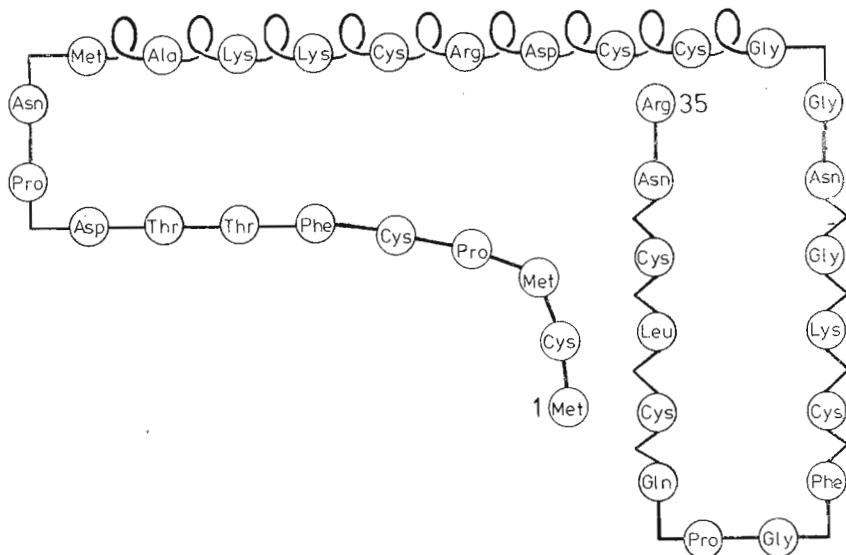


Рис. 22. Схематическое изображение вторичной структуры молекулы инсектотоксина $I_3A B. cyreus$ по данным спектроскопии ЯМР

остатка (рис. 21) вычислена для транс- и цис-конфигурации пептидной связи X-R₁ по данным для планарного L-пролина из библиотеки ЕСЕРР [32]. Минимальные и максимальные расстояния $d_1=d_1(\psi)$, $d_2=d_2(\varphi, \psi)$ и $d_3=d_3(\psi, \chi^1)$ рассчитаны по формулам, приведенным в работе [12]. Для регулярных структур типичные значения расстояний d_1 , d_2 и d_3 определяли изменением углов φ и ψ от идеальных значений (α -спираль $\varphi=-56^\circ$, $\psi=-44^\circ$, антипараллельная β -структура $\varphi=-136^\circ$, $\psi=134^\circ$, параллельная β -структура $\varphi=-114^\circ$, $\psi=114^\circ$ [33]) в интервале $\pm 20^\circ$ шагом 1° . При расчете типичных значений d_3 для каждого значения угла ψ угол χ^1 варьировали от -180 до 180° .

ЛИТЕРАТУРА

1. Rochat H., Bernard P., Couraud F. In: Adv. Cytopharmacol. N. Y.: Raven Press, 1979, v. 3, p. 325-334.
2. Beneski D. A., Catteral W. A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, № 1, p. 639-643.
3. Гришин Е. В., Солдатов Н. М., Овчинников Ю. А. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 6, с. 914-922.
4. Zlotkin E., Teitelbaum Z., Lestez D., Lazarovici P. Nat. Toxins, Proc. Int. Symp. Animal, Plant and Microbial Toxins, 6th, 1979 / Eds Eaker D., Waldstrom T. Oxford: Pergamon Press, 1980, p. 637-646.
5. Гришин Е. В., Солдатов Н. М., Ташмухамедов Б. А., Атакузиев Б. У. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 4, с. 450-461.
6. Fontecilla-Camps J. C., Almasy R. J., Suddath F. L., Watt D. D., Bugg C. E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, № 11, p. 6496-6500.
7. Fontecilla-Camps J. C., Almasy R. J., Ealick S. E., Suddath F. L., Watt D. D., Feldman R. J. Trends in Biochem. Sci., 1979, v. 6, № 11, p. 291-296.
8. Жданова Л. Н., Адамович Т. Б., Назимов Н. В., Гришин Е. В., Овчинников Ю. А. Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 4, с. 485-493.
9. Гришин Е. В., Солдатова Л. Н., Солдатов Н. М., Косецкий П. В., Овчинников Ю. А. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 9, с. 1285-1294.
10. Гришин Е. В., Волкова Т. М., Солдатова Л. Н. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 2, с. 155-164.
11. Wuthrich K., Wieder G., Wagner G., Braun W. J. Mol. Biol., 1982, v. 155, № 3, p. 321-346.
12. Billeter M., Braun W., Wuthrich K. J. Mol. Biol., 1982, v. 155, № 3, p. 321-346.
13. Wagner G., Wuthrich K. J. Mol. Biol., 1982, v. 155, № 3, p. 347-366.
14. Wieder G., Lee K. H., Wuthrich K. J. Mol. Biol., 1982, v. 155, № 3, p. 367-384.
15. Arseniev A. S., Wieder G., Joubert F. J., Wuthrich K. J. Mol. Biol., 1982, v. 159, № 2, p. 323-351.
16. Wuthrich K. NMR in Biological Research: Peptides and Proteins. Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 1976.
17. Jardetzky O., Roberts G. C. K. NMR in Mol. Biol. N. Y.: Acad. Press, 1981.
18. Englander S. W., Downer N. W., Teitelbaum H. In: Annu. Rev. Biochem., 1972, v. 41, p. 903-924.
19. Aue W. P., Bartholdi E., Ernst R. R. J. Chem. Phys., 1976, v. 64, № 5, p. 2229-2246.
20. Nagayama K., Wuthrich K., Ernst R. R. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1979, v. 90, № 1, p. 305-311.
21. Bystrov V. F., Arseniev A. S., Gavrillov Yu. D. J. Magn. Res., 1978, v. 30, № 2, p. 151-184.
22. Быстров В. Ф., Оханов В. В., Арсеньев А. С., Афанасьев В. А., Гуревич А. З. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 3, с. 386-392.
23. Okhanov V. V., Afanasiev V. A., Bystrov V. F. J. Magn. Res., 1980, v. 40, № 1, p. 191-195.
24. Gray W. R. Methods in Enzymol., 1967, v. 11, p. 469-475.
25. Липкин В. М., Адамова Н. А., Фейгина М. Ю., Жикulina Е. Е., Виноградова Е. П. Биохимия, 1972, т. 37, № 2, с. 410-413.
26. Anil Kumar, Wagner G., Ernst R. R., Wuthrich K. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1980, v. 96, № 3, p. 1156-1163.
27. Nagayama K., Anil Kumar, Wuthrich K., Ernst R. R. J. Magn. Res., 1980, v. 40, № 2, p. 321-334.
28. Jeener J., Meier B. H., Bachmann P., Ernst R. R. J. Chem. Phys., 1979, v. 71, № 11, p. 4546-4553.
29. Anil Kumar, Ernst R. R., Wuthrich K. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1980, v. 95, № 1, p. 1-6.
30. Bax A., Freeman R. J. Magn. Res., 1981, v. 44, № 3, p. 542-561.
31. Anil Kumar, Wagner G., Ernst R. R., Wuthrich K. J. Amer. Chem. Soc., 1981, v. 103, № 13, p. 3654-3658.
32. Momany F. A., McGuire R. F., Burgess A. W., Scheraga H. A. J. Phys. Chem., 1975, v. 79, № 22, p. 2361-2381.

33. Mandel N., Mandel G., Trus B. L., Rosenberg J., Carlson G., Dickerson R. E. J. Biol. Chem., 1977, v. 252, № 13, p. 4619-4636.

Поступила в редакцию
16.XII.1989

SECONDARY STRUCTURE AND SEQUENTIAL RESONANCE ASSIGNMENTS
IN TWO-DIMENSIONAL PROTON MAGNETIC RESONANCE SPECTRA
OF INSECTOTOXIN I₃A *BUTHUS EUPEUS*

ARSENIEV A. S., KONDAKOV V. I., MAIOROV V. N., VOLKOVA T. M.,
GRISHIN E. V., BYSTROV V. F., OVCHINNIKOV Yu. A.

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

The complete assignment of the 500 MHz ¹H nuclear magnetic resonance spectrum of the insectotoxin I₃A isolated from *Buthus eupeus* scorpion venom is performed by two-dimensional spectroscopy. The analysis of nuclear Overhauser effects for the protons of neighbouring residues in the amino acid sequence established the secondary structure of the molecule: α -helical part from Asn¹¹ to Gly²¹ and *anti*-parallel β -structure from Asn²³ to Asn³⁴ with the β -turn Phe²⁷-Gly²⁸-Pro²⁹-Gln³⁰. Three X-Pro peptide bonds have *trans* configuration. The primary structure of isotoxin was corrected by NMR and confirmed by sequencing.