



УДК 598.12.156-114.52:577.322.52:543.422.25

## ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА И КОНФОРМАЦИОННАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ЦИТОТОКСИНА II *Naja naja oxiana*

© 1996 г. Д. В. Дементьева, Ю. Н. Уткин, А. С. Арсеньев<sup>#</sup>Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 23.11.95 г.

В двумерных спектрах <sup>1</sup>H-ЯМР цитотоксина II (СТII) *Naja naja oxiana* проведено отнесение сигналов для всех 60 аминокислотных остатков как основной, так и минорной компоненты спектра. Установлено, что наличие минорной компоненты – следствие конформационной гетерогенности СТII. Скорости дейтерообмена амидных протонов измерены в <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O при pH 5.0 и 10°C. Полученные данные (*d*-связи, КССВ протонов H–NC<sup>α</sup>–H, контакты ЯЭО) позволили определить вторичную структуру двух конформационных состояний СТII, соответствующих основной и минорной компонентам спектра. Обе структуры представлены β-слоем из двух антипараллельных β-тяжей, включающих остатки 2–5 и 10–13, и β-слоем из трех антипараллельных β-тяжей (20–26, 35–39 и 49–55) и наиболее резко различаются характером β-поворота 6–9, который обусловлен *транс*-конфигурацией пептидной связи Val7–Pro8 в основной конформации и ее *цис*-конфигурацией в минорной. Структуры остальных β-поворотов, часть из которых причислена к регулярным, и структура C-концевого участка у двух конформеров радикально не различаются.

**Ключевые слова:** ЯМР, цитотоксины, кардиотоксины, белки, вторичная структура, конформационная гетерогенность, *цис-транс-изомерия*.

Среди компонентов яда кобры присутствуют белковые токсины трех видов: нейротоксины с длинной цепью, нейротоксины с короткой цепью и кардиотоксины, которые называют также цитотоксинами. В отличие от нейротоксинов структурно-функциональная взаимосвязь цитотоксинов изучена слабо. Известно, что “мишень” цитотоксинов – нервные и мышечные клетки, а результатом их действия является деполяризация мембран [1, 2]. При высоких концентрациях цитотоксины вызывают лизис различных типов клеток [3–5]. Функциональные свойства цитотоксинов обусловлены их взаимодействием с клеточной мембраной, которое реализуется иногда путем их встраивания в мембрану с образованием ионных каналов [6]. При этом нарушаются структурная организация мембраны и нормальное функционирование клетки [7–9]. Существует также гипотеза о том, что в токсическое действие цитотоксинов вовлечены отдельные мембранные белки, с которыми они избирательно связываются [10, 11].

Локализация функционально активных участков и механизм связывания цитотоксина с мембраной остается пока предметом дискуссии. Тем не

менее, согласно последним исследованиям, не вызывает сомнения функциональная роль двух гидрофобных участков (представленных в виде петель): первого, который расположен до инвариантного в кардиотоксинах остатка Lys12 [5, 7–9, 12–14], и второго, который находится между 27-м и 34-м аминокислотными остатками [9, 14, 15] (рис. 1). Для дальнейшего выяснения структурно-функциональной взаимосвязи у цитотоксинов необходимо иметь исчерпывающую информацию об их пространственной структуре.

Предположения о структурно-функциональной гетерогенности цитотоксинов [15, 16] делают еще более важным исследование новых цитотоксинов. На настоящий момент определены пространственные структуры лишь нескольких цитотоксинов: кардиотоксина V<sub>4</sub><sup>II</sup> *Naja mossambica mossambica* (методом рентгеноструктурного анализа [17]), кардиотоксина СТХIIb из того же яда [18], кардиотоксинов СТХI [19], СТХII [20], СТХIII [21] и СТХV [15] *Naja naja atra* (методом ЯМР), токсина γ *Naja nigricollis* (методами рентгеноструктурного анализа [22] и ЯМР [16]). Данная работа посвящена определению методом ЯМР вторичной структуры основной и минорной (обнаруженной в процессе исследования) конформаций цитотоксина II (СТII) *N. n. oxiana*.

На этапе отнесения сигналов в двумерных (2D) спектрах <sup>1</sup>H-ЯМР нами была установлена

Сокращения: СТII – цитотоксин II *Naja naja oxiana*, 2D – двумерный, ЯЭО – ядерный эффект Оверхаузера, DQF-COSY – корреляционная спектроскопия с использованием двухквантового фильтра, TOCSY – тотальная корреляционная спектроскопия, NOESY – спектроскопия ЯЭО.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: 330-59-29, 330-74-83).

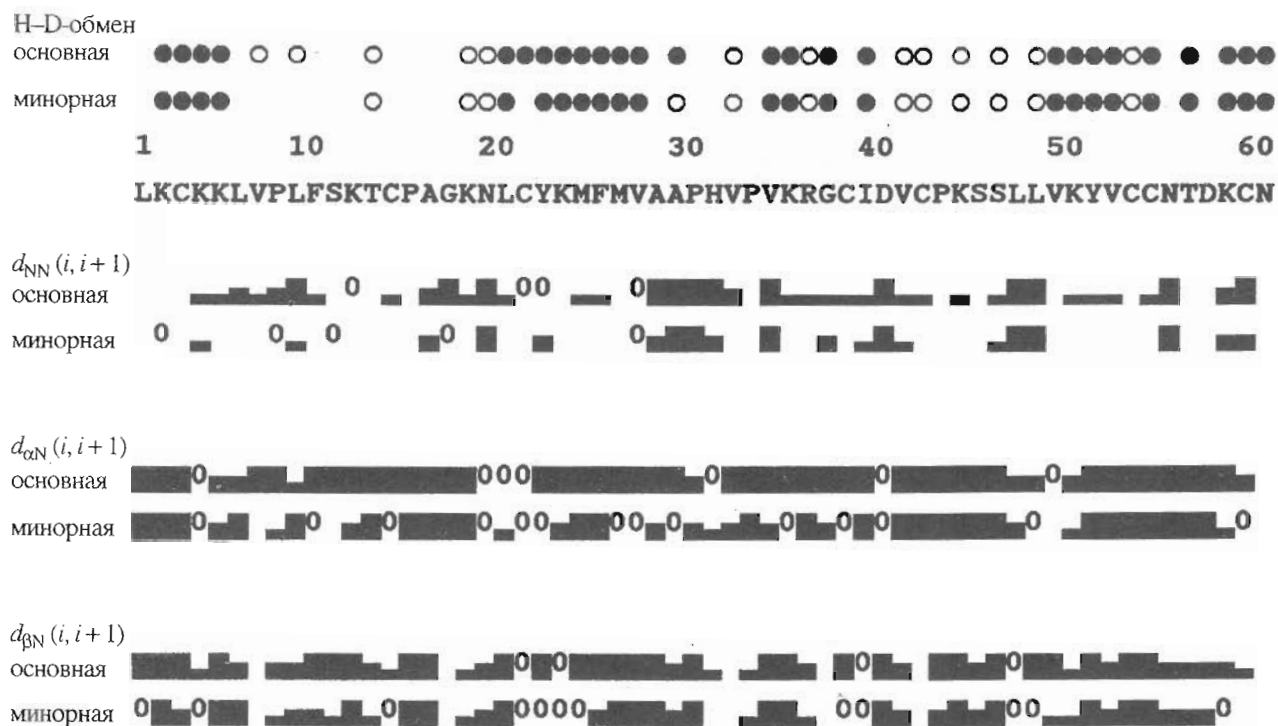


Рис. 1. Аминокислотная последовательность СТП и карта  $d$ -связей с участием протонов NH ( $C^{\delta}H_2$  – в случае пролинов),  $C^{\alpha}H$  и  $C^{\beta}H$ . Высота темных прямоугольников характеризует интенсивности кросс-пиков ЯЭО в спектре NOESY 200 мс, “0” означает, что соответствующий кросс-пик перекрыт. ○ – остатки, протоны NH которых видны только в снятом первым спектре TOCSY; ● – остатки, протоны NH которых видны в снятом последнем спектре TOCSY после растворения образца в  $^2H_2O$  (см. “Экспер. часть”). Результаты представлены для обеих конформаций.

гетерогенность образца СТП. Так, в NH/ $C^{\alpha}H$ -области спектра DQF-COSY СТП в  $H_2O$  (рис. 2) присутствуют не 54 кросс-пика NH/ $C^{\alpha}H$ , как предполагалось (60 аминокислотных остатков минус N-концевой остаток и 5 остатков пролина), а 94 кросс-пика. После обнаружения минорной “примеси” СТП был подвергнут дополнительной очистке (см. “Экспер. часть”), но спектр ЯМР после этого не изменился. Определение на секвенаторе аминокислотной последовательности 22 N-концевых остатков белка, для которых при последовательном отнесении сигналов (см. ниже) было установлено самое большое различие в химических сдвигах сигналов между соответствующими остатками двух компонент спектра, подтвердило первоначальную аминокислотную последовательность. Результаты масс-спектрометрического анализа СТП показали, что белок однороден по молекулярной массе и, следовательно, по аминокислотному составу.

Результаты хроматографии, определения аминокислотной последовательности на секвенаторе, масс-спектрометрии и последовательного отнесения сигналов в спектрах ЯМР (см. ниже), взятые вместе, свидетельствуют об отсутствии различий в первичной структуре двух компонент спектра СТП. Таким образом, наличие минорной компоненты в спектрах ЯМР указывает на конформационную гетерогенность СТП в растворе.

После нагревания раствора СТП в  $H_2O$  до  $75^{\circ}C$  (тепловая денатурация) и охлаждения до  $30^{\circ}C$  был снят спектр  $^1H$ -ЯМР, который затем сравнили со спектром, снятым при  $30^{\circ}C$  до нагрева образца. Сравнение показало, что белок ренатурирует в те же структурные формы и в том же соотношении, что и до нагрева. Кроме того, широкие линии в спектрах, появляющиеся при наличии конформационного обмена, отсутствовали. Эти факты свидетельствуют о конформационной стабильности обоих состояний белка.

Так как интенсивность кросс-пиков в 2D-спектрах зависит от многих факторов [23] и часто не пропорциональна содержанию соединения в растворе, принадлежность данного кросс-пика к основной или минорной компоненте не всегда очевидна. Кроме того, отнесение сигналов в спектрах  $^1H$ -ЯМР СТП было осложнено тем, что химические сдвиги сигналов эквивалентных протонов двух конформационных состояний могли быть как очень близкими, так и значительно различаться (см. рис. 3).

Анализ спектров DQF-COSY, TOCSY и NOESY проводился по классической схеме последовательного отнесения сигналов в спектрах  $^1H$ -ЯМР [23]. На первом этапе были отмечены все кросс-пики NH/ $C^{\alpha}H$ -области спектра DQF-COSY в  $H_2O$ .

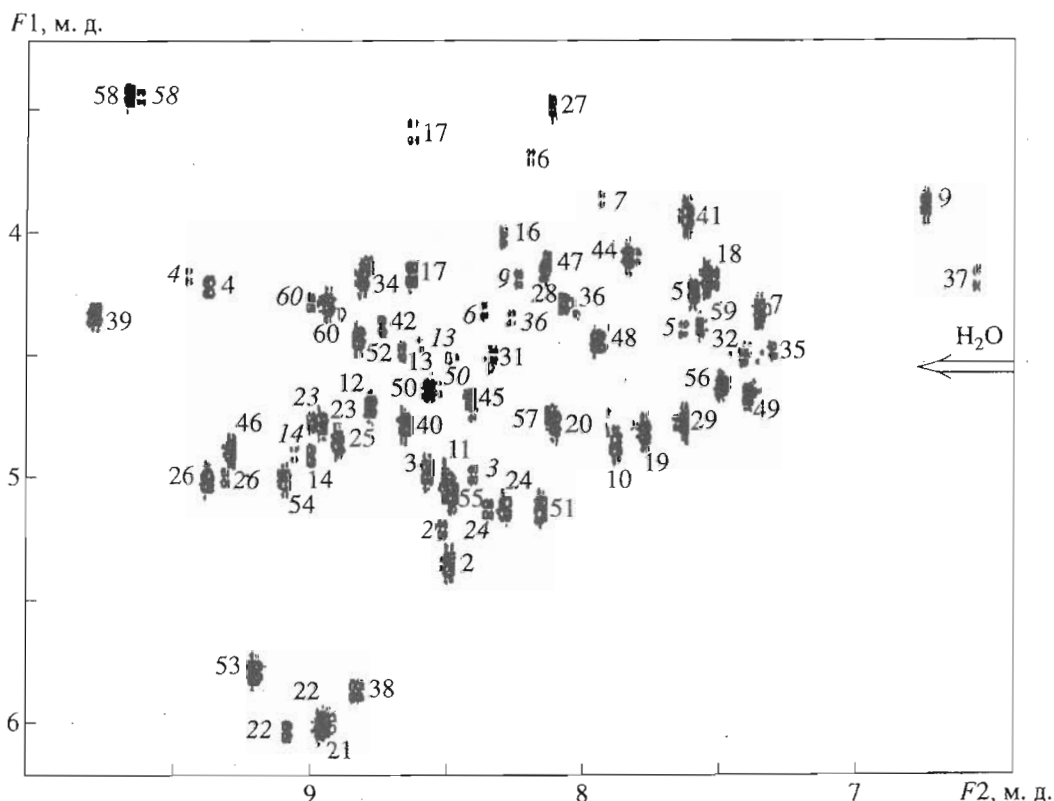


Рис. 2. Область кросс-пиков NH/C $\alpha$ H спектра DQF-COSY СТII в H $_2$ O (pH 5.0, 42°C). Приведены номера остатков в аминокислотной последовательности СТII для кросс-пиков основной компоненты и неперекрывтых кросс-пиков минорной компоненты (курсив).

Далее среди кросс-пиков от протонов NH в спектре TOCSY в H $_2$ O были выделены спиновые системы трех категорий: 1) системы, которые можно отнести к остатку определенного типа, 2) АМХ-системы, 3) все другие спиновые системы, которые представляют собой остатки с "длинными" боковыми цепями [23] (рис. 4). Отнесение сигналов протонов, принадлежащих выделенным спиновым системам, было продолжено в алифатической области DQF-COSY- и TOCSY-спектров.

Если удавалось найти две гомологичные спиновые системы, у которых все протоны различались по химическим сдвигам сигналов менее чем на 0.1 м. д., то спиновая система с меньшей интенсивностью кросс-пиков предварительно приписывалась минорной компоненте того же аминокислотного остатка. Таким способом удалось выделить часть спиновых систем минорной компоненты.

К первой категории спиновых систем принадлежат остатки Gly, Ala, Thr, Ser, Val и Ile, каждый из которых однозначно отождествляется с определенной спиновой системой исходя из характерного расположения кросс-пиков, химических сдвигов и мультиплетной структуры сигналов [23].

Спиновые системы 2 остатков глицина отнесены с учетом большой геминальной константы спин-спинового взаимодействия (KCCB) протонов

C $\alpha$ H и наличия кросс-пиков одного протона NH с двумя протонами C $\alpha$ H. 3 остатка аланина и 2 остатка треонина характеризуются наличием интенсивных кросс-пиков на метильную группу, а также в

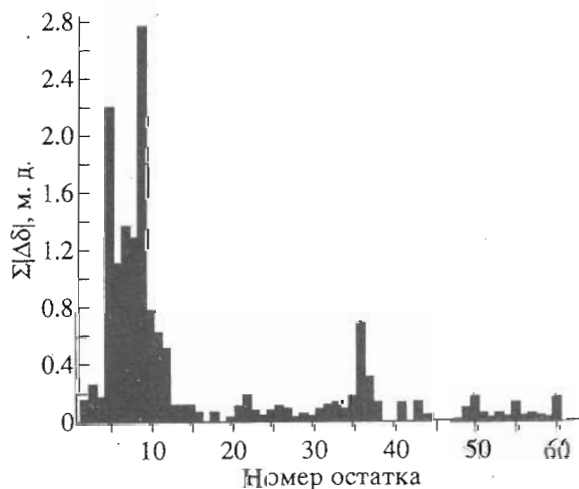


Рис. 3. Гистограмма суммированных для каждого остатка абсолютных отличий химических сдвигов сигналов протонов основного конформационного состояния от минорного. Учитывали химические сдвиги сигналов амидных протонов основной цепи ( $\delta$ -протонов в случае пролинов),  $\alpha$ - и  $\beta$ -протонов.

F1, м. д.

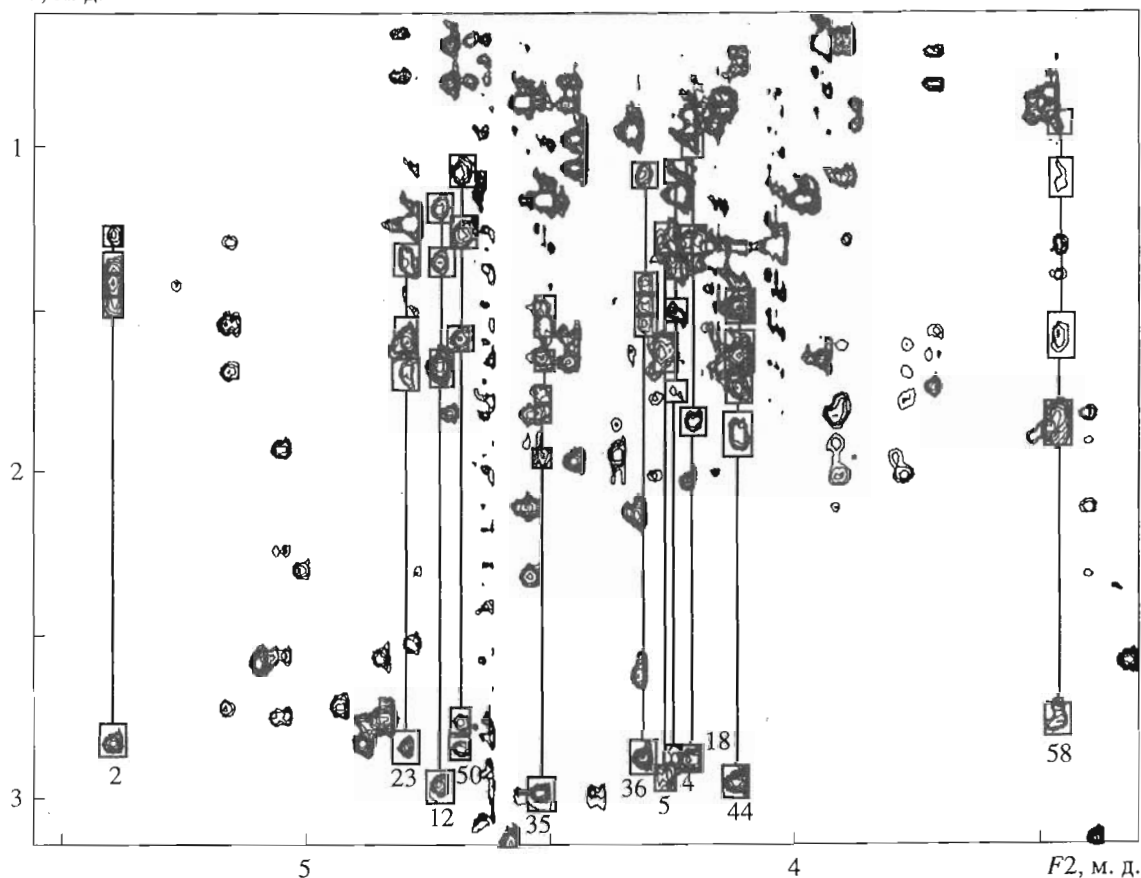


Рис. 4. Спиновые системы 10 остатков лизина и 1 остатка аргинина основной формы СТII в спектре TOCSY 90 мс в  $^2\text{H}_2\text{O}$  (рН 5.0,  $30^\circ\text{C}$ ). Кросс-пики на  $\alpha$ -протон указанных остатков выделены в рамки и соединены вертикальными линиями в рамках для каждого остатка. Кросс-пики  $\text{C}^\alpha\text{H}/\text{C}^\epsilon\text{H}_2$  лизинов и  $\text{C}^\alpha\text{H}/\text{C}^\delta\text{H}_2$  аргинина отмечены номерами соответствующих остатков.

случае остатков Thr наличием расположенных близко к диагонали кросс-пиков  $\text{C}^\alpha\text{H}/\text{C}^\beta\text{H}$ . 2 из 3 остатков серина распознаны как AMX-спиновые системы, у которых химические сдвиги всех протонов больше 3.4 м. д. Кросс-пики  $\text{C}^\alpha\text{H}/\text{C}^\beta\text{H}$  7 остатков валина и 1 остатка изолейцина, находящиеся далеко от диагонали, найдены исходя из того, что  $\alpha$ -протон должен образовать только один кросс-пик с  $\beta$ -протоном. У всех валинов разница в химических сдвигах между метильными группами оказалась небольшой (см. таблицу). Спиновая система единственного остатка изолейцина найдена сначала в спектре DQF-COSY по характерной тройке кросс-пиков: один  $\text{C}^\beta\text{H}/\text{C}^\gamma\text{H}_3$  и два  $\text{C}^\alpha\text{H}_2/\text{C}^\delta\text{H}_3$ , но сигналы его протонов  $\text{C}^\alpha\text{H}$  и NH были окончательно определены только из спектра NOESY при последовательном отнесении, так как в спектре TOCSY наблюдался кросс-пик NH только с  $\text{C}^\alpha\text{H}$ -протоном.

Вторая категория спиновых систем включает остатки Asp, Asn, Cys, Tyr, Phe и His (СТII не содержит остатка Trp). Кросс-пики алифатических про-

тонов этих остатков идентифицируются как типичные AMX-спиновые системы [23], т.е. системы, у которых химические сдвиги сигналов  $\beta$ -протонов находятся в более слабом поле (обычно больше 2.5 м. д.), чем у остатков с "длинными" боковыми цепями. Дальнейшая идентификация остатков в этой группе началась с выделения остатков Phe, Tyr и His и основывалась на внутриостаточных кросс-пиках ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) между алифатическими протонами и протонами ароматического кольца в спектре NOESY СТII в  $^2\text{H}_2\text{O}$ .

Спиновые системы трех аспарагинов были выбраны из AMX-систем исходя из наличия в спектре NOESY СТII в  $\text{H}_2\text{O}$  кросс-пиков ЯЭО между протонами  $\text{C}^\beta\text{H}_2$  и протонами амидной группы боковой цепи.

Таким образом, все AMX-системы, кроме 8 остатков цистеина и 2 остатков аспарагиновой кислоты, были отнесены к определенным остаткам безотносительно их положения в аминокислотной последовательности СТII. Однако следует отметить, что осложняющими факторами было совпадение

Химические сдвиги\* сигналов протонов и КССВ протонов  $\text{H}-\text{NC}^{\alpha}-\text{H}$  основной и минорной (курсив) конформаций цитотоксина *II N. n. oxiana* в  $\text{H}_2\text{O}$  (pH 5.0, 27°C)

Остаток	Химический сдвиг, м. д.					КССВ, Гц
	NH	C <sup>α</sup> H	C <sup>β</sup> H	C <sup>γ</sup> H	Другие	
Leu1		4.09	1.49	1.42	C <sup>δ</sup> H <sub>3</sub> : 0.70, 0.78	
		4.09	1.49	1.42	C <sup>δ</sup> H <sub>3</sub> : 0.70, 0.78	
Lys2	8.48	5.39	1.40	1.25, 1.35	C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 1.44	10.0
	8.50	5.26	1.40	1.21, 1.29	C <sup>ε</sup> H <sub>2</sub> : 2.82 C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 1.41, 1.48 C <sup>ε</sup> H <sub>2</sub> : 2.80	9.9
Cys3	8.61	5.00	2.29, 2.83			10.1
	8.45	5.02	2.36, 2.83			10.3
Lys4	9.39	4.22	1.35, 1.75	1.05	C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 1.50	9.0
	9.45	4.19	1.30, 1.72	0.99	C <sup>ε</sup> H <sub>2</sub> : 2.83 C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 1.53 C <sup>ε</sup> H <sub>2</sub> : 2.92	9.5
Lys5	7.63	4.25	1.62, 2.15	1.25, 1.32	C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 1.63	9.5
	7.61	4.41	1.17, 1.87	0.89	C <sup>ε</sup> H <sub>2</sub> : 2.94 C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 1.61, 1.86 C <sup>ε</sup> H <sub>2</sub> : 2.94	10.5
Leu6	8.25	3.70	1.62, 1.72	1.54	C <sup>δ</sup> H <sub>3</sub> : 0.69, 0.80	6.8
	8.53	4.32	1.65, 1.54	1.53	C <sup>δ</sup> H <sub>3</sub> : 0.70, 0.76	9.4
Val7	7.43	4.32	2.11	0.93, 0.96		9.5
	8.02	3.87	1.95	0.85, 0.93		7.2
Pro8		4.35	1.94, 2.03	1.84, 1.96	C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 3.78, 3.93	
		4.48	2.00, 2.24	1.54	C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 3.34, 3.49	
Leu9	6.85	3.89	1.08	1.27	C <sup>δ</sup> H <sub>3</sub> : 0.67, 0.70	7.9
	8.42	4.16	1.39, 1.70	1.72	C <sup>δ</sup> H <sub>3</sub> : 0.80, 0.88	7.4
Phe10	7.92	4.88	2.82, 3.20		2,6H: 7.22	9.6
	7.82	4.48	3.05, 3.15		3,5H: 7.30 4H: ~7.28 2,6H: 7.24 3,5H: 7.33 4H: ~7.27	9.0
Ser11	8.57	5.05	3.46, 3.53			9.5
	8.39	4.72	3.50, 3.60			7.9
Lys12	8.80	4.72	1.66	1.15, 1.32	C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 1.57, 1.67	8.9
	8.43	4.63	1.64	1.15, 1.32	C <sup>ε</sup> H <sub>2</sub> : 2.94 C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 1.57, 1.67 C <sup>ε</sup> H <sub>2</sub> : 2.94	7.5
Thr13	8.73	4.50	3.97	1.15		8.4
	8.68	4.48	3.95	1.16		8.0
Cys14	9.03	4.92	2.70, 3.45			6.3
	9.12	4.92	2.70, 3.43			6.0
Pro15		4.52	1.91, 2.31	1.81, 2.11	C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 3.38, 3.90	
		4.53	1.92, 2.31	1.81, 2.11	C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 3.47, 3.90	

Таблица. Продолжение

Остаток	Химический сдвиг, м. д.					КССВ, Гц
	NH	C <sup>α</sup> H	C <sup>β</sup> H	C <sup>γ</sup> H	Другие	
Ala16	8.39	4.03		1.29		6.3
	8.39	4.05		1.25		—
Gly17	8.73	3.59, 4.18				
	8.73	3.59, 4.18				
Lys18	7.53	4.20	1.82	0.97, 1.24	C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 1.46 C <sup>ε</sup> H <sub>2</sub> : 2.88	9.0
	7.51	4.20	1.80	0.97, 1.27	C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 1.46 C <sup>ε</sup> H <sub>2</sub> : 2.88	8.9
Asn19	7.87	4.85	2.55, 2.92		N <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 6.90, 7.42	9.8
	7.87	4.85	2.55, 2.92		N <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 6.90, 7.42	—
Leu20	8.10	4.81	1.28, 1.60	1.43	C <sup>δ</sup> H <sub>3</sub> : 0.65, 0.78	9.9
	8.10	4.79	1.28, 1.60	1.43	C <sup>δ</sup> H <sub>3</sub> : 0.65, 0.78	—
Cys21	8.98	6.02	2.88, 2.98			9.9
	9.07	6.03	2.88, 2.98			9.6
Tyr22	8.99	6.02	2.88, 3.04		2,6H: 6.58 3,5H: 6.53	8.7
	9.14	6.02	2.89, 3.02		2,6H: 6.60 3,5H: 6.57	9.2
Lys23	8.95	4.79	1.57, 1.67	1.34	C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 1.58 C <sup>ε</sup> H <sub>2</sub> : 2.83	9.7
	8.99	4.78	1.58, 1.68	1.34	C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 1.58 C <sup>ε</sup> H <sub>2</sub> : 2.83	9.9
Met24	8.28	5.14	1.52, 1.68	1.25	C <sup>ε</sup> H <sub>3</sub> : 1.81	10.0
	8.31	5.15	1.52, 1.68	1.25	C <sup>ε</sup> H <sub>3</sub> : 1.81	10.0
Phe25	8.92	4.85	2.75, 2.80		3,5H: 7.00 2,6H: 6.75 4H: 7.12	9.6
	8.89	4.89	2.75, 2.80		3,5H: 7.00 2,6H: 6.75 4H: 7.12	9.8
Met26	9.39	5.04	1.92, 2.23	2.55, 2.74	C <sup>ε</sup> H <sub>3</sub> : 1.99	9.1
	9.34	5.01	1.90, 2.23	2.55, 2.74	C <sup>ε</sup> H <sub>3</sub> : 1.99	9.2
Val27	8.15	3.46	1.85	0.82, 0.89		6.5
	8.15	3.50	1.87	0.84, 0.90		—
Ala28	8.20	4.15	1.34			6.5
	8.20	4.17	1.34			—
Ala29	7.64	4.79	1.20			8.5
	7.67	4.78	1.20			8.2
Pro30		4.10	1.88, 1.37	1.34	C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 3.47	
		4.10	1.87, 1.37	1.34	C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 3.48	
His31	8.41	4.54	3.10, 3.30		2H: 8.32 4H: 7.03	8.5
	8.41	4.54	3.12, 3.36		2H: 8.12 4H: 7.03	—
Val32	7.44	4.53	2.09	0.79, 0.83		10.0
	7.40	4.50	2.08	0.78, 0.83		10.0
Pro33		4.27	1.60, 1.67	1.77, 2.02	C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 3.76, 3.88	
		4.32	1.60, 1.71	1.77, 2.02	C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 3.74, 3.86	
Val34	8.90	4.20	2.00	0.89, 0.94		10.0
	8.91	4.15	1.99	0.89, 0.94		9.7

Таблица. Продолжение

Остаток	Химический сдвиг, м. д.					КССВ, Гц
	NH	C <sup>α</sup> H	C <sup>β</sup> H	C <sup>γ</sup> H	Другие	
Lys35	7.31	4.51	<b>1.63</b> , 1.96	1.48, 1.55	C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 1.74, 1.80 C <sup>ε</sup> H <sub>2</sub> : 2.97	8.2
	7.39	4.55	<b>1.62</b> , 2.00	1.48, 1.55	C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 1.74, 1.81 C <sup>ε</sup> H <sub>2</sub> : 2.98	7.9
Arg36	8.17	4.30	<b>1.05</b> , 1.47	1.40, 1.53	C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 2.87 N <sup>ε</sup> H: 7.88	8.1
	8.39	4.35	<b>1.27</b> , 1.66	1.40, 1.53	C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 2.91 N <sup>ε</sup> H: 7.88	7.4
Gly37	6.58	3.76, 4.21				
	6.78	3.81, 4.29				
Cys38	8.83	5.88	2.80, <b>3.43</b>			10.8
	8.88	5.83	2.81, <b>3.45</b>			9.9
Ile39	9.78	4.32	1.63	1.33, 1.56	C <sup>δ</sup> H <sub>3</sub> : 0.32 C <sup>γ</sup> H <sub>3</sub> : 0.46	8.7
	9.78	4.32	1.63	1.33, 1.56	C <sup>δ</sup> H <sub>3</sub> : 0.32 C <sup>γ</sup> H <sub>3</sub> : 0.46	—
Asp40	8.64	4.81	2.75			8.9
	8.64	4.81	2.75			—
Val41	7.63	3.93	1.62	0.67, 0.68		10.3
	7.63	3.93	1.68	0.72, 0.73		—
Cys42	8.83	4.39	2.67, <b>2.98</b>			6.9
	8.83	4.39	2.67, <b>2.98</b>			—
Pro43		3.95	0.16, 1.62	0.54, 1.16	C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 2.40, 3.83	
		3.95	0.16, 1.62	0.57, 1.16	C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 2.42, 3.83	
Lys44	7.91	4.10	<b>1.65</b> , 1.72	1.46	C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 1.49 C <sup>ε</sup> H <sub>2</sub> : 2.96	6.9
	7.87	4.10	<b>1.65</b> , 1.72	1.46	C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 1.49 C <sup>ε</sup> H <sub>2</sub> : 2.96	6.9
Ser45	8.50	4.70	<b>3.95</b> , 4.35			7.4
	8.50	4.70	<b>3.95</b> , 4.35			—
Ser46	9.38	4.91	3.88, 4.38			9.4
	9.38	4.91	3.88, 4.38			—
Leu47	8.18	4.13	1.54, <b>1.68</b>	1.64	C <sup>δ</sup> H <sub>3</sub> : 0.83, 0.88	5.9
	8.18	4.13	1.54, <b>1.68</b>	1.64	C <sup>δ</sup> H <sub>3</sub> : 0.83, 0.88	—
Leu48	8.00	4.45	1.54, <b>1.65</b>	1.57	C <sup>δ</sup> H <sub>3</sub> : 0.79, 0.86	9.7
	7.99	4.45	1.54, <b>1.65</b>	1.57	C <sup>δ</sup> H <sub>3</sub> : 0.79, 0.86	—
Val49	7.42	4.69	1.81	0.67, 0.78		9.5
	7.40	4.64	1.80	0.66, 0.78		9.5
Lys50	8.59	4.67	1.05, 1.26	1.24	C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 1.58 C <sup>ε</sup> H <sub>2</sub> : 2.76, 2.84	9.7
	8.55	4.65	0.98, 1.22	1.24	C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 1.57 C <sup>ε</sup> H <sub>2</sub> : 2.70, 2.84	9.3

Таблица. Окончание

Остаток	Химический сдвиг, м. д.					КССВ, Гц
	NH	C <sup>α</sup> H	C <sup>β</sup> H	C <sup>γ</sup> H	Другие	
Tyr51	8.18	5.15	2.53, <b>2.71</b>		2,6H: 6.65 3,5H: 6.47	10.0
	8.16	5.17	2.53, <b>2.70</b>		2,6H: 6.67 3,5H: 6.52	10.0
Val52	8.84	4.45	1.96	0.97, 1.05		9.6
	8.84	4.46	1.97	0.97, 1.05		—
Cys53	9.33	5.82	<b>2.97</b> , 3.69			10.2
	9.30	5.80	<b>2.97</b> , 3.69			10.2
Cys54	9.10	5.02	3.36, 3.55			7.9
	9.12	5.01	3.36, 3.55			7.5
Asn55	8.50	5.09	2.57, 3.31		N <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 6.66, 7.45	9.8
	8.50	5.12	2.65, 3.29		N <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 6.66, 7.45	—
Thr56	7.51	4.64	4.23	1.13		10.0
	7.50	4.63	4.22	1.13		—
Asp57	8.19	4.79	2.29, <b>2.52</b>			8.8
	8.19	4.76	2.32, <b>2.52</b>			—
Lys58	9.72	3.45	1.80	0.92, 1.09	C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 1.57 C <sup>ε</sup> H <sub>2</sub> : 2.77	8.4
	9.69	3.46	1.80	0.92, 1.09	C <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 1.57 C <sup>ε</sup> H <sub>2</sub> : 2.77	8.4
Cys59	7.58	4.39	3.32, 3.55			6.2
	7.55	4.39	3.32, 3.55			5.6
Asn60	8.98	4.32	2.13, 2.61		N <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 7.28	8.7
	9.06	4.32	2.10, 2.56		N <sup>δ</sup> H <sub>2</sub> : 7.32	8.7

\* Химические сдвиги β-протонов, находящихся в *транс*-ориентации относительно α-протонов, выделены жирным шрифтом.

химических сдвигов сигналов двух β-протонов остатка Asp40, а также отсутствие кросс-пиков NH/C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> остатка Asp57 в спектре TOCSY СТИ в H<sub>2</sub>O.

К третьему классу спиновых систем относятся аминокислотные остатки с "длинными" боковыми цепями: Met, Leu, Pro, Arg и Lys (СТИ не содержит остатков Glu и Gln). Идентификация кросс-пиков протонов C<sup>α</sup>H/C<sup>β</sup>H этих остатков часто затруднена по сравнению с АМХ-системами, так как сигналы протонов C<sup>β</sup>H находятся в той же области спектра, что и сигналы протонов C<sup>γ</sup>H, т.е., как правило, в области с более сильным полем, чем 2.3 м. д. Отнесение сигналов протонов "длинных" боковых цепей проводилось при совместном анализе спектров DQF-COSY и TOCSY. Спиновые системы протонов боковых цепей 1 остатка аргинина и 10 остатков лизина СТИ были установлены при анализе кросс-пиков C<sup>α</sup>H/C<sup>β</sup>H, C<sup>γ</sup>H, C<sup>δ</sup>H и C<sup>α</sup>H/C<sup>β</sup>H, C<sup>γ</sup>H, C<sup>δ</sup>H, C<sup>ε</sup>H в спектре TOCSY с временем смешивания 90 мс (рис. 4).

Для остатка Arg отнесение кросс-пиков к C<sup>α</sup>H/C<sup>β</sup>H или C<sup>α</sup>H/C<sup>γ</sup>H в спектре TOCSY получено при сравнении с кросс-пиками C<sup>α</sup>H/C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> и менее различимыми C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>/C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub> в спектре DQF-COSY. Отнесение сигналов протонов остатка Arg было подтверждено наличием кросс-пиков N<sup>ε</sup>H/C<sup>δ</sup>H, C<sup>γ</sup>H, C<sup>β</sup>H в спектре TOCSY СТИ в H<sub>2</sub>O. Сигналы протонов остатков лизина соотношены с β-, γ- или δ-положением протона в боковой цепи остатка таким же образом при сравнении спектров TOCSY и DQF-COSY.

Спиновые системы протонов 6 остатков лейцина идентифицированы при анализе комбинации спектров DQF-COSY и TOCSY с учетом характерных пар симметричных кросс-пиков C<sup>γ</sup>H/C<sup>δ</sup>H<sub>3</sub> в сильнополюсной области спектра. 1 из 2 остатков Met имеет сигнал от протонов C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub> с необычным для него химическим сдвигом 1.25 м. д., и поэтому его идентификация была подтверждена окончательно на этапе последовательного отнесения. Синглетные сигналы протонов C<sup>ε</sup>H<sub>3</sub> остатков



Met24 и Met26 найдены в одномерном спектре в типичной для них области – около 2.0 м. д. Кросс-пики NH/C<sup>α</sup>H<sub>3</sub> для Met24 и C<sup>α</sup>H, C<sup>β</sup>H, C<sup>γ</sup>H/C<sup>ε</sup>H<sub>3</sub> для Met26 в спектре NOESY позволили провести полную идентификацию сигналов метионинов.

Во избежание неясностей и пробелов при последовательном отнесении сигналов выделение спиновых систем остатков пролина крайне важно. Отнесение сигналов пролинов начинали с нахождения в спектре DQF-COSY интенсивных кросс-пигов между двумя протонами C<sup>δ</sup>H с типичными химическими сдвигами сигналов в диапазоне 3.4–4.0 м. д. и далее продолжали, используя комбинацию спектров DQF-COSY и TOCSY. Таким образом были выделены 7 спиновых систем остатков пролина. Нестандартным по своим химическим сдвигам оказался Pro43, у которого сигнал одного из протонов C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub> находится при 2.4 м. д., сигналы протонов C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> – при 0.16 и 1.62 м. д., а сигналы C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub> – при 0.54 и 1.16 м. д. (таблица). Трудным оказалось отнесение сигналов Pro30 из-за вырожденности сигналов в двух парах метиленовых протонов (C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub> и C<sup>γ</sup>H<sub>2</sub>). Правильность отнесения сигналов остатков пролина была окончательно подтверждена при последовательном отнесении сигналов.

Согласно способу, указанному выше, были найдены минорные компоненты для остатков: 1 Gly, 1 Ala, 2 Thr, 1 Phe, 1 Tyr, 2 Asn, 1 Asp, 5 Cys, 2 Met, 1 Leu, 8 Lys и 1 Pro.

Тем не менее общее число спиновых систем, без учета отнесенных минорных сигналов, оказалось больше, чем необходимо согласно аминокислотной последовательности СТП. Предполагалось, что “избыточные” спиновые системы остатков принадлежали минорному конформационному состоянию.

Наличие двух конформаций белка в растворе затрудняло последовательное отнесение, поэтому сначала оно было осуществлено только для основной компоненты спектра.

Последовательное отнесение сигналов СТП базировалось на анализе спектра NOESY 200 мс, снятого в H<sub>2</sub>O при 27°C; использование других спектров NOESY будет оговариваться особо.

Последовательное отнесение сигналов протонов СТП проведено по стандартной методике [23], в основном по кросс-пикам ЯЭО между протонами NH (или δ-протонами в случае пролинов) и C<sup>α</sup>H предыдущего остатка (рис. 1), и не вызывало затруднений, за исключением случаев, обсуждаемых ниже.

Необходимые для последовательного отнесения *d*-связи между протонами Lys3 и Lys4 и *d*<sub>αN</sub>-связь между Lys12 и Thr13 установлены в спектре NOESY, полученном при 42°C. Кросс-пик ЯЭО C<sup>α</sup>H Lys4/NH Lys5 совпал с собственным кросс-пиком NH/C<sup>α</sup>H Lys5, но были обнаружены кросс-пики C<sup>β</sup>H Lys4/NH Lys5 и NH Lys4/NH Lys5

малой интенсивности. Один из двух кросс-пигов C<sup>α</sup>H<sub>2</sub> Gly17/NH Lys18 оказался перекрыт, но при этом присутствовал интенсивный кросс-пик NH Gly17/NH Lys18. Кросс-пик ЯЭО C<sup>α</sup>H Asn19/NH Leu20 был перекрыт, но наблюдались сильная *d*<sub>NN</sub>- и более слабые *d*<sub>βN</sub>-связи для этих остатков. Незначительное различие (меньше 0.01 м. д.) в химических сдвигах сигналов протонов NH и C<sup>α</sup>H остатков Tyr22 и Cys21 (таблица) затруднило определение *d*-связей между ними. Совпадение химических сдвигов сигналов протонов C<sup>α</sup>H Val49 и Lys50 не позволило определить *d*<sub>αN</sub>-связь, но наличие кросс-пигов ЯЭО с NH Lys50 на C<sup>β</sup>H и обе C<sup>γ</sup>H<sub>3</sub>-группы валина помогло идентифицировать Lys50. Кросс-пик C<sup>α</sup>H Lys50/NH Tyr51, перекрываемый сигналом воды в спектре NOESY при 27°C, обнаружен при 42°C. Последовательное отнесение сигналов остатков с Pro43 по Thr56 показано на рис. 5.

Все сигналы остатков пролина были отнесены стандартно по кросс-пикам ЯЭО между δ-протонами пролина и α-протоном предыдущего остатка. Наличие указанных кросс-пигов ЯЭО свидетельствует о том, что все пептидные связи пролинов в основном компоненте белка имеют *транс*-конфигурацию [23].

Однозначное последовательное отнесение сигналов основной компоненты спектра (таблица) позволило четко отделить их от сигналов минорной компоненты. Поэтому следующим шагом было последовательное отнесение сигналов минорной компоненты, которое осуществлялось по той же методике, что и отнесение основной компоненты. Если минорная компонента какого-либо остатка не была найдена по указанному ранее способу, то предполагалось, что она полностью совпадает с основной либо к ней относятся любая из оставшихся неотнесенными спиновых систем. При этом, несмотря на данные по определению аминокислотной последовательности на секвенаторе и масс-спектрометрии СТП, допускалось, что первичные структуры, соответствующие основной и минорной компонентам спектра, могут различаться. Результатом последовательного отнесения сигналов минорного конформационного состояния стала полная его идентификация в спектрах ЯМР СТП (таблица), подтвердившая отсутствие различий в аминокислотной последовательности двух состояний. Существенные отличия основного конформационного состояния СТП от минорного в наблюдаемых *d*-связях были выявлены для остатков от Lys5 до Lys12 (рис. 1).

Различия в химических сдвигах основных и минорных сигналов протонов, суммированные на рис. 3, говорят о различном микроокружении ряда остатков для разных состояний СТП. Для остатков с наибольшим отличием химических сдвигов сигналов, приблизительно с 5-го по 12-й, предполагается изменение конформации, тогда как небольшие

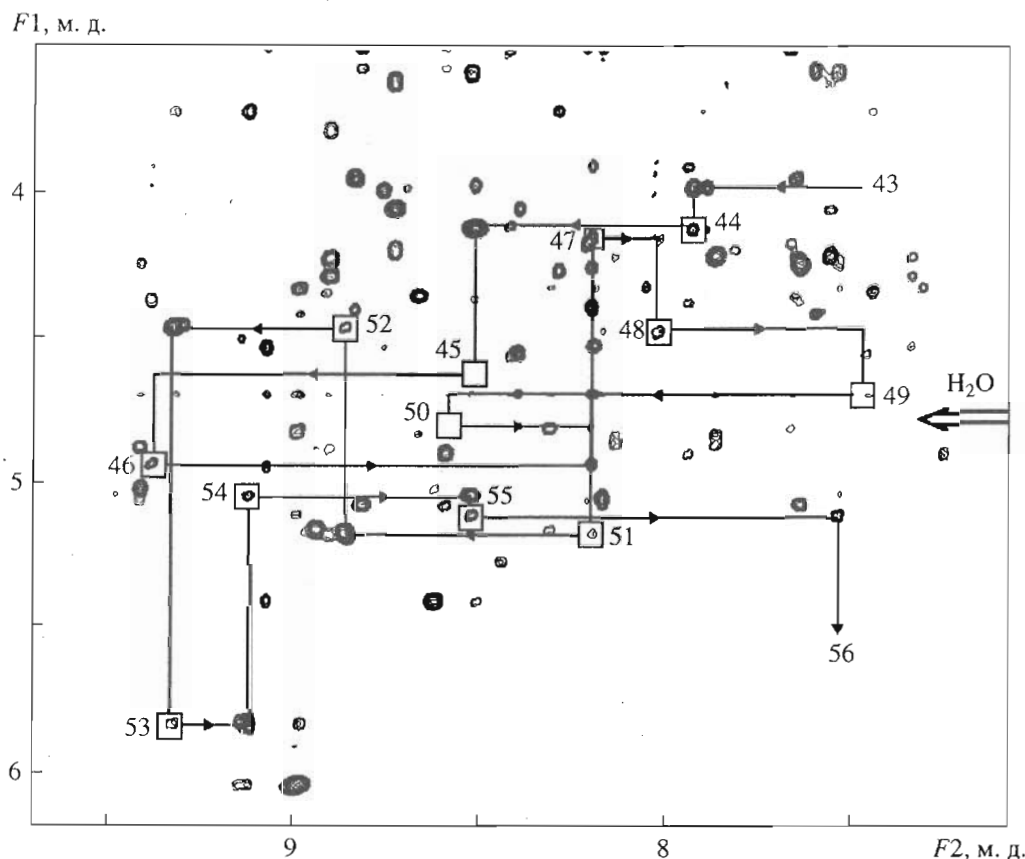


Рис. 5. Пример последовательного отнесения сигналов, с Pro43 по Thr56 основной конформации СТII, в спектре NOESY 200 мс в  $\text{H}_2\text{O}$  (рН 5.0,  $27^\circ\text{C}$ ). Номера остатков аминокислотной последовательности указаны рядом с собственными пиками  $\text{NH}/\text{C}^\alpha\text{H}$ . Горизонтальные линии берут начало с кросс-пика  $\text{NH}/\text{C}^\alpha\text{H}$   $i$ -го остатка и заканчиваются на кросс-пике между протонами  $\text{C}^\alpha\text{H}$   $i$ -го остатка и  $\text{NH}$  ( $i+1$ )-го. Кросс-пики от протонов  $\text{C}^\alpha\text{H}$  Ser45, Val49 и Lys50 подавлены радиочастотным полем, используемым для насыщения сильного сигнала растворителя.

отличия в химических сдвигах можно ожидать у пространственно близких к ним остатков.

Существенные различия между двумя компонентами в значениях КССВ протонов  $\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H}$  наблюдаются с 4-го по 12-й остаток. Меньшие, но заметные отклонения в значениях КССВ протонов  $\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H}$  обнаружены для остатков 35–38. Связано ли это с небольшим изменением конформации участка 35–38 или только с погрешностью измерений КССВ, станет ясно после расчета пространственной структуры СТII.

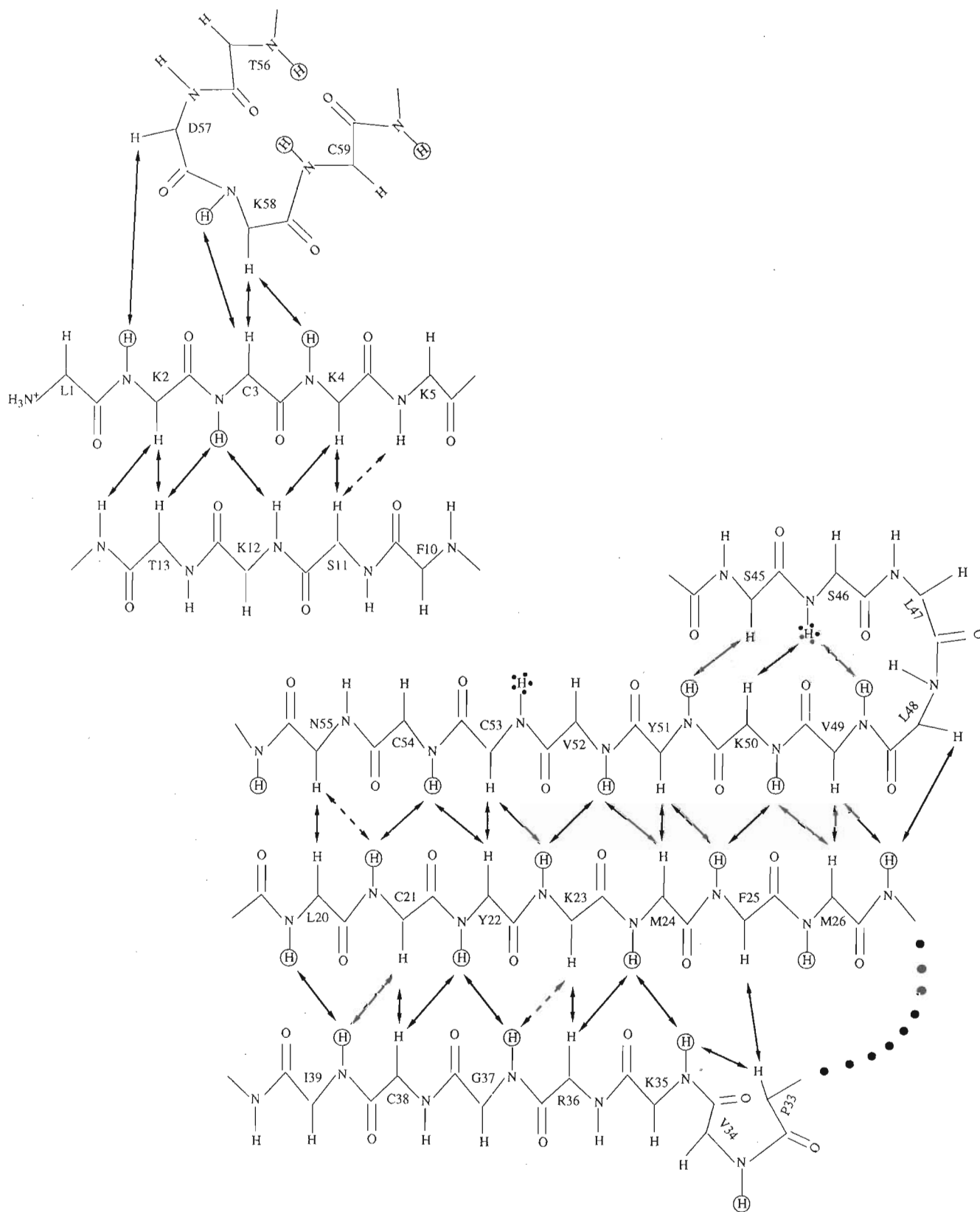
После измерения КССВ протонов  $\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H}$  стало возможным корректное определение количественного соотношения обоих конформационных состояний. Сравнение интенсивностей основных и минорных кросс-пиков  $\text{NH}/\text{C}^\alpha\text{H}$  спектра DCF-COSY тех остатков, для которых значения КССВ основной и минорной компонент сигналов протонов  $\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H}$  совпадают, показало, что соотношение минорной и основной конформации составляет 1 : 6.

КССВ протонов  $\text{H}-\text{C}^\alpha\text{C}^\beta-\text{H}$  не выявили ни для одного остатка явных различий между двумя ком-

понентами СТII в ориентации, *gauche* или *trans*,  $\beta$ -протонов относительно протонов  $\text{C}^\alpha\text{H}$ .

Выводы о преобладающих типах вторичной структуры можно сделать из анализа  $d$ -связей (рис. 1). По известному критерию [23] преобладание интенсивных кросс-пиков ЯЭО с протоном  $\text{C}^\alpha\text{H}$  на протон  $\text{NH}$  последующего остатка почти на всем протяжении полипептидной цепи и малое количество сильных  $d_{\text{NN}}$ -связей – прямое указание на то, что вторичная структура состоит преимущественно из развернутых участков полипептидной цепи. Этот вывод подтверждается большими значениями КССВ протонов  $\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H}$  ( $>8$  Гц), наблюдаемыми для большинства аминокислотных остатков СТII (таблица).

Дальнейший анализ спектров NOESY в  $\text{H}_2\text{O}$  и  $^2\text{H}_2\text{O}$  выявил многочисленные контакты ЯЭО между протонами, расположенными в различных развернутых участках полипептидной цепи. Все полученные данные однозначно согласуются с представлением вторичной структуры белка как двух  $\beta$ -слоев (рис. 6). Первый слой состоит из трех антипараллельных  $\beta$ -тяжей, включающих



**Рис. 6.** Вторичная структура СТП *N. p. oxiana*. Сплошные стрелки указывают на кросс-пики ЯЭО, наблюдаемые для основной и минорной конформаций, прерывистые стрелки – на кросс-пики ЯЭО, наблюдаемые только для основной конформации. Результаты дейтерообмена, представленные на рисунке, совпали для обеих конформаций СТП: амидные протоны основной цепи, обнаруженные только в первом спектре ТОСЯ, обведены пунктиром (Ser46 и Cys53); наблюдаемые в последнем спектре ТОСЯ после растворения образца в  $^2\text{H}_2\text{O}$  (см. “Экспер. часть”) – сплошной линией.

остатки 20–26, 35–39 и 49–55. Второй  $\beta$ -слой состоит из двух антипараллельных  $\beta$ -цепей, включающих остатки 2–5 и 10–13.

Наличие водородных связей, скрепляющих отдельные тяжи  $\beta$ -слоев, подтверждается данными о скоростях обмена с растворителем амидных протонов основной цепи белка (см. рис. 6). Так, например, все амидные протоны среднего тяжа (остатки 20–26) из трех составляющих первый  $\beta$ -слой обмениваются медленно, а у двух периферических цепей того же слоя медленно обменивающиеся амидные протоны чередуются с быстро обменивающимися, что согласуется с найденной структурой.

Наличие большого количества  $\beta$ -поворотов очевидно, так как основными элементами вторичной структуры СТП являются  $\beta$ -тяжи. Один из  $\beta$ -поворотов образован остатками 6–9, однако данные дейтерообмена говорят об отсутствии стабильной водородной связи между остатками 6 и 9, поэтому причислить этот поворот к стандартным нельзя.

Нестандартный  $\beta$ -поворот образуют остатки 14–18. Определение точной конформации этого поворота будет возможно после расчета пространственной структуры СТП. Наличие у этого поворота Pro во 2-м положении и Gly в 4-м предполагает, что он относится к типу "греческий ключ" (другое название –  $\beta$ -арка) [24].

Еще один  $\beta$ -поворот образован петлей 26–35. Судя по имеющимся кросс-пикам ЯЭО (см. рис. 6), Pro33 и Val134 образуют  $\beta$ -горб ( $\beta$ -bulge) типа G1 [25]. Наличие  $\beta$ -горба объясняется, вероятно, необходимостью скорректировать направление полипептидной цепи после его изменения в компактной петле [24] и таким образом продолжить формирование  $\beta$ -слоя.

Группа остатков 40–45 образует кросс-поворот +2х с правой закруткой [25], соединяя внешние тяжи трехтяжевого  $\beta$ -слоя. Наличие такого поворота подтверждается многочисленными кросс-пиками ЯЭО между протонами остатков 40–45 и указанного  $\beta$ -слоя.

Участок структуры 46–49, вероятно, относится к  $\beta$ -повороту типа I, что следует из наличия водородной связи между карбонилем Ser46 и амидной группой Val49, значений КССВ протонов  $\text{H}-\text{NC}^{\alpha}-\text{H}$  и  $d$ -связей (таблица и рис. 1) [23].

Медленно обменивающиеся амидные протоны в участке 56–60 СТП наблюдаются у всех остатков, кроме Asp57 (см. рис. 6), и можно предположить, какие именно водородные связи здесь присутствуют. Но по КССВ протонов  $\text{H}-\text{NC}^{\alpha}-\text{H}$  и  $d$ -связям не удалось определить тип регулярной структуры этого участка.

Сравнение КССВ,  $d$ -связей и контактов ЯЭО (таблица, рис. 1 и 6), выявленных для основной и минорной компонент, показало, что главные со-

ставляющие вторичной структуры,  $\beta$ -слои, претерпевают лишь незначительные, локальные изменения, не влияющие на вид структуры в целом. На участках  $\beta$ -слоев самые большие отличия в перечисленных параметрах наблюдаются в остатках 10–13, что может говорить о некотором изменении конформации остатков этого  $\beta$ -тяжа и/или изменении взаимного расположения тяжей 10–13 и 2–5 в рамках  $\beta$ -слоя.

Анализ  $\beta$ -поворотов минорной и основной конформаций по стандартным ЯМР-параметрам ( $d$ -связи, скорости дейтерообмена, КССВ, контакты ЯЭО) выявил для петли 6–9 существенные различия. Наличие сильных кросс-пиков с  $\text{C}^{\alpha}\text{H Val17}$  на оба  $\text{C}^{\delta}\text{H Pro8}$  свидетельствует о *транс*-конфигурации пептидной связи Val17–Pro8 в основной конформации. В то же время отсутствие аналогичных кросс-пиков и наличие интенсивного кросс-пика  $\text{C}^{\alpha}\text{H Val17}/\text{C}^{\alpha}\text{H Pro8}$  свидетельствует о *цис*-конфигурации пептидной связи Val17–Pro8 в минорной форме [23, 26]. Согласно Ричардсон [25], все  $\beta$ -повороты с *цис*-конфигурацией пептидной связи X–Pro относятся к самостоятельному типу VI. Значительные конформационные изменения данного поворота, по-видимому, несколько влияют на структуру  $\beta$ -тяжа 10–13, которая обсуждалась выше. Следует отметить, что, судя по  $d$ -связям (рис. 1), другие четыре пролина имеют *транс*-конфигурации пептидных связей X–Pro в обеих конформациях СТП.

Небольшое изменение КССВ протонов  $\text{H}-\text{NC}^{\alpha}-\text{H}$  и  $d$ -связей C-концевой части минорной формы по сравнению с основной, по-видимому, происходит из-за ее пространственной близости к конформационно изменившемуся участку 6–12 СТП, о чем свидетельствуют соответствующие кросс-пики ЯЭО (рис. 6).

Таким образом, основные различия наблюдаемых конформаций СТП локализованы на участке 6–12 и вызваны изменением конфигурации пептидной связи Val17–Pro8. Упоминание о наличии минорных конформационных состояний в 2 из 5 ранее изученных методом ЯМР цитотоксинах [19, 27] указывает на то, что это скорее их общая функциональная и/или структурная особенность, чем исключение. К сожалению, ни в одном из известных нам случаев минорные конформации подробно изучены не были.

Характерной особенностью пролинов является их присутствие в  $\beta$ -поворотах [24], что наблюдается и в СТП. В функциональное изменение конформации белка чаще всего вовлекаются петли и боковые цепи [24]. Поэтому можно предположить, что минорная конформация рассматриваемого цитотоксина с измененной пространственной структурой петли 6–9 – форма, необходимая для функционирования данного белка.

При сравнении цитотоксинов с нейротоксинами наибольшее различие в первичной и вторичной структурах было обнаружено на участке 6–11 [19–21]. Этот участок, как предполагается в [21], определяет функциональную специфику цитотоксинов, т.е. их способность проникать в мембрану и образовывать в ней гидрофобный кластер, в результате чего мембрана деформируется и структурно изменяется [28]. Функциональная значимость этого участка подтверждается исследованиями различных цитотоксинов [5, 7–9, 12–14]. Интересно, что остаток Pro8 присутствует во всех известных (кроме нескольких, где пролин находится в девятой позиции) цитотоксинах яда змей семейства Elapidae [29].

Согласно исследованиям других цитотоксинов [16–22], гомологичных СТИ, их вторичная структура в основном повторяет рассматриваемую. Интересно, что в установленных методом спектроскопии ЯМР структурах кардиотоксинов [16, 18–21] отмечается недостаточно точное определение пространственной структуры участка 6–9, что объяснялось конформационной подвижностью этого участка [18].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Выделение СТИ** осуществлялось по методике [30], затем СТИ подвергали дополнительной очистке с помощью высокоэффективной ионообменной хроматографии на колонке (4 × 250 мм) НЕМА ВЮ 1000СМ (Tessek Ltd, Чехия) в градиенте ацетата аммония (рН 7.5) от 0.4 до 1 М. Аналитическая хроматография на колонке Nucleosil C<sub>8</sub> (Machery-Nagel, ФРГ) в градиенте ацетонитрила в 0.1% трифторуксусной кислоте (от 10 до 40% за 30 мин) показала 96% чистоту исследуемого СТИ.

**Аминокислотную последовательность** определяли для первых 22 остатков с N-конца СТИ. Восстановленный пиридилэтилированный СТИ очищали ВЭЖХ на Nucleosil C<sub>8</sub> и подвергали автоматической деградации по Эдману на секвенаторе 470А фирмы Applied Biosystems (США).

**Восстановление и алкилирование белка.** Дисульфидные связи в СТИ восстанавливали дитиоэритритом и алкилировали образующиеся свободные SH-группы 4-винилпиридином по методике [31].

**Масс-спектрометрия СТИ.** Масс-спектры были получены на трехфазном квадрупольном масс-спектрометре TSQ 700 фирмы Finnigan-MAT, снабженном электрораспыляющим ионным источником. Электрораспыляющая игла работала при ускоряющем напряжении 4 кВ. Анализируемый образец был растворен в смеси 1% уксусной кислоты (50%) и метанола (50%), а затем введен в ионный источник со скоростью потока 1 мкл/мин.

**Спектроскопия ЯМР.** СТИ (20 мг) был помещен в 0.6 мл раствора (0.5 мл H<sub>2</sub>O и 0.1 мл <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O) 30 mM Na-фосфатного буфера при рН 5.0. Для ряда экспериментов предварительно лиофилизованный образец был растворен в 99.9% <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O.

Все <sup>1</sup>H-ЯМР-эксперименты проводились на спектрометре Unity-600 (Varian, США). Серия 2D-экспериментов DQF-COSY (27 и 42°C), TOCSY 40 мс (10, 30, 42°C) и 80 мс (30°C), NOESY 50, 100, 200 мс (30 и 42°C), 80 и 120 мс (10 и 27°C) выполнена для раствора СТИ в H<sub>2</sub>O. Еще одна серия DQF-COSY (30°C), TOCSY 40 мс (27°C), 10, 20, 30, 40, 50 и 90 мс (30°C), NOESY 100, 120 и 200 мс (27°C) проведена для раствора токсина в <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O. Как правило, 2D-спектры были записаны с периодом детектирования в 256 мс и 4096 эквидистантными точками и с периодом эволюции, варьирующим в диапазоне 0–25 мс, с 400 эквидистантными точками.

Для измерения скоростей дейтерообмена амидных протонов белка образец был лиофилизован из H<sub>2</sub>O (рН 5.0), затем растворен в <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O. Восемь экспериментов TOCSY 40 мс по 96 мин каждый при 10°C стартовали соответственно в 0, 210, 402, 594, 786, 1074, 1362 и 1635 мин. Между экспериментами образец сохранялся при 10°C.

Для измерения КССВ вицинальных протонов H-NC<sup>α</sup>-H или H-C<sup>α</sup>C<sup>β</sup>-H были сняты спектры DQF-COSY для раствора СТИ в H<sub>2</sub>O при 30 и 42°C и в <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O при 30°C. Эти спектры были записаны с периодом детектирования в 512 мс и 8192 эквидистантными точками и с периодом эволюции, варьирующим в диапазоне 0–32 мс (0–64 мс в <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O), с 512 (с 1024 в <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O) эквидистантными точками.

Ширина спектров во всех экспериментах составила 8000 Гц по обоим направлениям.

Обработка данных осуществлялась на компьютерах SUN SparcStation программой VNMR (Varian, США).

Авторы благодарят Т.А. Богданову (ИБХ РАН) за определение N-концевой аминокислотной последовательности, доктора П.Франке (Институт биохимии Свободного университета Берлина) за масс-спектрометрический анализ, а также профессора В.И. Цетлина (ИБХ РАН) за конструктивную дискуссию.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Harvey A.L. // J. Toxicol.-Toxin. 1985. V. 4. P. 41–69.
2. Dufton M.J., Hider R.C. // Pharmacol. Theor. 1988. V. 36. P. 1–40.
3. Takechi M., Tanaka Y., Hayashi K. // FEBS Lett. 1986. V. 205. P. 143–146.
4. Hinman C.L., Lepisto E., Stevens R., Montgomery I.N., Rauch H.C., Hudson R.A. // Toxicon. 1987. V. 25. P. 1011–1014.

5. Gatineau E., Takeshi M., Bouet F., Mansuelle P., Rochat H., Harvey A.L., Montenay-Garestier T., Menez A. // *Biochemistry*. 1990. V. 29. P. 6480–6489.
6. Ксенжек О.С., Гевод В.С., Омельченко А.М., Семенов С.Н., Сотниченко А.И., Мирошников А.И. // *Молекуляр. биология*. 1978. Т. 12. С. 1057–1065.
7. Dufourcq J., Faucon J.F., Bernard E., Pezolet M., Teissier M., Bougis P., Van Rietschoten J., Delori P., Rochat H. // *Toxicon*. 1982. V. 20. P. 165–174.
8. Bougis P.E., Teissier M., Van Rietschoten J., Rochat H., Faucon J.F., Dufourcq J. // *Mol. Cell. Biochem.* 1983. V. 55. P. 49–64.
9. Menez A., Gatineau E., Roumestand C., Harvey A.L., Mouawad L., Gilquin B., Toma F. // *Biochimie*. 1990. V. 72. P. 575–588.
10. Dufton M.J., Hider R.C. // *Snake Toxins* / Ed. A.L. Harvey. N.Y.: Pergamon Press, 1991. P. 259–302.
11. Klowden M.J., Vitale A.J., Trumble M.J., Wesson C.R., Trumble W.R. // *Toxicon*. 1992. V. 30. P. 295–301.
12. Gatineau E., Toma F., Montenay-Garestier Th., Takechi M., Fromageot P., Menez A. // *Biochemistry*. 1987. V. 26. P. 8046–8055.
13. Marchot P., Bougis P.E., Ceard B., Van Rietschoten J., Rochat H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988. V. 153. P. 642–647.
14. Chien K.-Y., Chiang C.-M., Hsen Y.-C., Vyas A.A., Rules G.C., Wu W.-G. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 14473–14483.
15. Singhal A.K., Chien K.-Y., Wu W.-G., Rule G.S. // *Biochemistry*. 1993. V. 32. P. 8036–8044.
16. Gilquin B., Roumestand C., Zinn-Justin S., Menez A., Toma F. // *Biopolymers*. 1993. V. 33. P. 1659–1675.
17. Rees B., Bilwes A., Samama J.P., Moras D. // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 214. P. 281–297.
18. O'Connell J.F., Bougis P.E., Wuthrich K. // *Eur. J. Biochem.* 1993. V. 213. P. 891–900.
19. Janke W., Mierke D.F., Beress L., Kessler H. // *J. Mol. Biol.* 1994. V. 240. P. 445–458.
20. Bhaskaran R., Huang C.C., Tsai Y.C., Jayaraman G., Chang D.K., Yu C. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 23500–23508.
21. Bhaskaran R., Huang C.C., Chang D.K., Yu C. // *J. Mol. Biol.* 1994. V. 235. P. 1291–1301.
22. Menez R., Menez A. // *J. Mol. Biol.* 1994. V. 239. P. 122–136.
23. Wuthrich K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. N.Y.: Wiley, 1986.
24. Richardson J.S., Richardson D.C. // *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation* / Ed. G.D. Fasman. N.Y., L.: Plenum Press, 1989. P. 1–99.
25. Richardson J.S. // *Adv. Protein. Chem.* 1981. V. 34. P. 167–339.
26. Wuthrich K., Billeter M., Braun W. // *J. Mol. Biol.* 1984. V. 180. P. 715–740.
27. Otting G., Steinmetz W.E., Bougis P.E., Rochat H., Wuthrich K. // *Eur. J. Biochem.* 1987. V. 168. P. 609–620.
28. Faucon J.F., Dufoureq J., Couraud F., Rochat H. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1979. V. 554. P. 332–339.
29. Dufton M.J., Hider R.C. // *Pharmac. Ther.* 1988. V. 36. P. 1–40.
30. Гришин Е.В., Сухих А.П., Адамович Т.Б., Овчинников Ю.А. // *Биоорг. химия*. 1976. Т. 2. С. 1018–1034.
31. Hermodson M.A., Ericsson L.H., Neurath H., Walsh K.A. // *Biochemistry*. 1973. V. 12. P. 3146–3153.

## Secondary Structure and Conformational Heterogeneity of Cytotoxin II from *Naja naja oxiana*

D. V. Dement'eva, Yu. N. Utkin, and A. S. Arseniev<sup>1</sup>

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

**Abstract**—The proton resonances of cytotoxin II from *Naja naja oxiana* were sequentially assigned in 2D <sup>1</sup>H NMR spectra for all of its 60 amino acid residues of both major and minor components of the spectra. The presence of the minor component was shown to be due to a conformational heterogeneity of the cytotoxin. The proton–deuterium exchange rates of amide groups were measured in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O at a pH of 5.0 and at 10°C. Experimental data obtained (*d*-connectivities, H–NC<sup>α</sup>–H coupling constants and long-range NOEs) allowed for the determination of the secondary structure of the two cytotoxin conformers. Both conformer structures contain two antiparallel β-sheets. The first β-sheet involves two antiparallel β-strands comprising the residues 2–5 and 10–13. The second sheet involves three antiparallel strands consisting of the residues 20–26, 35–39, and 49–55; its peripheral β-strands are connected by cross-over. The most striking structural difference between these conformers is the nature of the β-turn 6–9, which has *trans*- and *cis*-forms of the Val7–Pro8 peptide bond in the major and minor conformer, respectively. The structures of other β-turns, some of which are ascribed to standard types, and the C-termini are almost the same for the both conformers.

*Key words:* NMR, cytotoxins, cardiotoxins, proteins, secondary structure, conformational heterogeneity, *cis-trans isomerism*.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed; telephone 330 59 29 or 330 74 83.