



УДК 547.993+543.422.8

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОРМЫ И РАЗМЕРОВ МОЛЕКУЛЫ ЦИТОТОКСИНА Vc1 ЯДА СРЕДНЕАЗИАТСКОЙ КОБРЫ МЕТОДОМ МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ РЕНТГЕНОВСКИХ ЛУЧЕЙ

*Ойматов М., Арипов Т.Ф., Асланов Х.А.,  
Садыков А.С.*

*Институт биоорганической химии Академии наук УзССР, Ташкент*

*Асадчиков В.Е., Дембо А.Т.*

*Институт кристаллографии Академии наук СССР, Москва*

*Юкельсон Л.Я.*

*Институт биохимии Академии наук УзССР, Ташкент*

Методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей определены геометрические параметры молекулы цитотоксина Vc1 из яда среднеазиатской кобры *Naja oxiana* Eichwald: радиус инерции  $R_g$   $11,6 \pm 0,5$  Å, объем молекулы  $V$   $6200 \pm 600$  Å<sup>3</sup>, радиус инерции поперечного сечения  $R_q$   $5,5 \pm 0,3$  Å. При сравнении экспериментально полученной кривой рассеяния молекулы и кривых, рассчитанных для моделей различной формы, обнаружено хорошее совпадение с эллиптическим цилиндром с соотношением полуосей и полувысоты 1 : 0,75 : 2 и с трехосным эллипсоидом, имеющим соотношение полуосей 1 : 0,67 : 2,4. Рассчитанные объемы этих моделей также хорошо согласуются с объемом молекулы цитотоксина, полученным экспериментальным путем. Расчеты теоретических кривых рассеяния на моделях эллиптического цилиндра и трехосного эллипсоида показали, что экспериментальная кривая рассеяния цитотоксина с большой точностью совпадает с кривой рассеяния модели трехосного эллипсоида.

Цитотоксин Vc1, выделенный из яда среднеазиатской кобры *Naja oxiana* Eichwald: полипептид с молекулярным весом ~6000 относится к классу мембраноактивных веществ, нарушающих структуру и функцию биологических мембран [1, 2]. Существенный интерес представляет способность таких полипептидов потенцировать биологические эффекты фосфолипазы A<sub>2</sub>, связанные с мембранным действием фермента [3, 4]. Молекула цитотоксина состоит из 60 аминокислотных остатков и имеет четыре внутримолекулярные дисульфидные связи. Установленная аминокислотная последовательность [5] оказалась в высокой степени гомологичной последовательностям цитотоксинов из ядов других кобр. Однако сведения об организации более высоких структур молекул таких полипептидов в литературе пока ограничены. Метод малоуглового рассеяния рентгеновских лучей, использованный нами в работе, дает принципиальную возможность получения данных о форме, размерах и некоторых физических характеристиках цитотоксина в среде, близкой к естественному окружению.

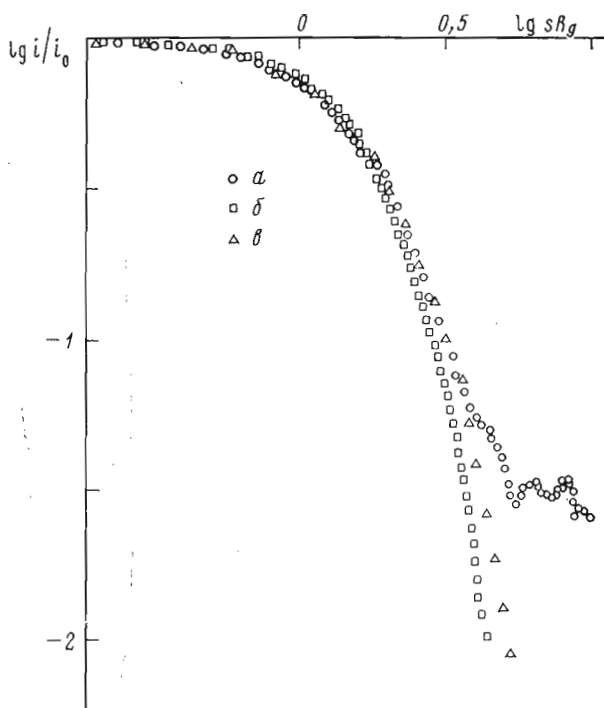


Рис. 1. Экспериментальная кривая рассеяния молекулы цитотоксина Vc1 (*a*) и теоретические кривые рассеяния моделей: *b* — эллиптический цилиндр с соотношением полуосей и полувысоты 1 : 0,75 : 2; *v* — трехосный эллипсоид с соотношением полуосей 1 : 0,87 : 2,4

Измерения интенсивности малоуглового рассеяния рентгеновских лучей проводились на щелевом дифрактометре ДРАМ-2,0 и на дифрактометре с щелевым гониометром фирмы «Rigaku Denki».

Концентрация цитотоксина в исходном растворе составляла 180 мг/мл. Последующие образцы готовили разбавлением исходного препарата до концентрации 75; 47,6; 37,5; 19 мг/мл.

Зависимость интенсивности рассеяния от концентрации наблюдалась вплоть до угла рассеяния  $2\theta = 2,2^\circ$ . Экстраполяция интенсивности рассеяния к нулевой концентрации проводилась до введения коллимационной поправки.

Поскольку результаты всех измерений для данного образца совпали в пределах ошибок эксперимента, мы можем считать, что белок в течение эксперимента не менял своих первоначальных параметров. Использованная методика проведения измерений и обработки экспериментальных данных описана в работах [6–8].

Полученная единая кривая рассеяния после введения коллимационной поправки представлена на рис. 1.

Радиус инерции молекулы цитотоксина Vc1  $R_g = 11,6 \pm 0,5 \text{ \AA}$  был определен из графика зависимости  $\lg i$  от  $s^2$  [9], в диапазоне значений  $s$  от 0 до  $0,135 \text{ \AA}^{-1}$  ( $s = 4\pi \sin \theta / \lambda$ ), где  $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$  — длина волны излучения,  $\theta$  — половина угла рассеяния (рис. 2). Для образцов с различной концентрацией цитотоксина были получены значения  $R_g$ , совпадающие в пределах ошибки эксперимента, что свидетельствует об отсутствии заметной межмолекулярной интерференции.

Объем молекулы цитотоксина  $V = 6200 \pm 600 \text{ \AA}^3$  был определен в диапа-

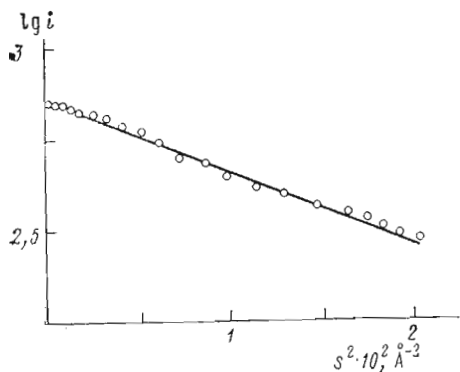


Рис. 2

Рис. 2. Начальный участок кривой рассеяния цитотоксина Vc1 в координатах Гинье

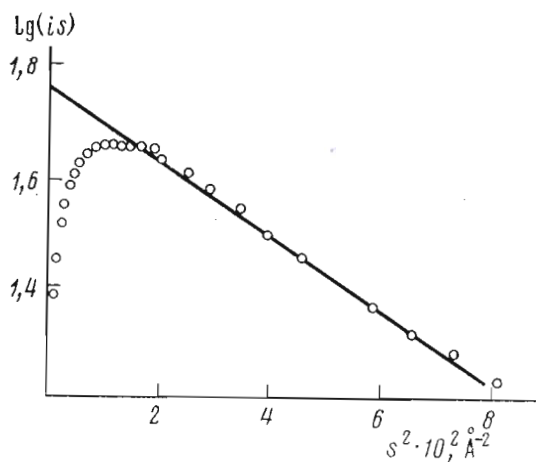


Рис. 3

Рис. 3. Интенсивность рассеяния молекулой цитотоксина Vc1 в координатах  $\lg(is)$  от  $s^2$

зоне значений  $s$  от 0 до  $0,40 \text{ \AA}^{-1}$  (рис. 3) по формуле

$$V = 0,8 \cdot 2\pi^2 i(0) / \int_0^{s_{\text{макс}}} i(s) s^2 ds [10].$$

Значительная протяженность области прямолинейного спада на кривой графика зависимости  $\lg(is)$  от  $s^2$  (рис. 3) свидетельствует о вытянутости молекулы цитотоксина [11]. Радиус инерции поперечного сечения молекулы, определенный по тангенсу угла наклона прямой, равен  $R_g = 5,5 \pm \pm 0,3 \text{ \AA}$ .

Полученная экспериментальная кривая рассеяния рентгеновских лучей молекулой цитотоксина Vc1 сравнивалась с расчетными кривыми рассеяния моделями различных форм. До падения интенсивности рассеяния на 1,2 порядка наблюдалось ее совпадение с теоретическими кривыми рассеяния моделей эллиптического цилиндра с соотношением полуосей и полувысоты  $1:0,75:2$  и трехосного эллипсоида с соотношением полуосей  $1:0,67:2,4$ .

Объемы этих моделей, вычисленные с учетом радиуса инерции  $R_g = 11,6 \text{ \AA}$  и радиуса инерции поперечного сечения  $R_g = 5,5 \text{ \AA}$ , оказались равными для эллиптического цилиндра  $6596 \text{ \AA}^3$ , а для трехосного эллипсоида  $6064 \text{ \AA}^3$ , что хорошо согласуется в пределах ошибок с объемом, полученным экспериментальным путем. Параметры эллиптического цилиндра при этом имеют следующие значения:  $a=8,9 \text{ \AA}$ ,  $b=6,7 \text{ \AA}$ ,  $h/2=17,8 \text{ \AA}$  ( $a$  и  $b$  — полуоси эллипса,  $h$  — высота), а параметры трехосного эллипсоида соответственно равны:  $a=9,7 \text{ \AA}$ ,  $b=6,4 \text{ \AA}$ ,  $c=23,2 \text{ \AA}$ . Для однозначного определения формы молекулы цитотоксина нами был проведен расчет кривых рассеяния на моделях указанных форм и размеров (рис. 1). Полученные результаты показали, что вплоть до падения интенсивности рассеяния на 1,2 порядка экспериментальная кривая с большой точностью совпадает с кривой рассеяния модели трехосного эллипсоида. При больших углах на экспериментальной кривой рассеяния выявляются побочные максимумы, связанные, по-видимому, с внутренней структурой молекулы. Наши данные, характеризующие возможную форму молекул цитотоксинов, не противоречат модели нейротоксических полипептидов из ядов кобр [12].

Авторы выражают благодарность Л. А. Фейгину за обсуждение полученных результатов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Юкельсон Л. Я., Садыков Э., Сорокин В. М. Выделение и характеристика «прямого» гемолитического фактора яда среднеазиатской кобры.— Биохимия, 1974, т. 39, вып. 4, с. 816—821.
2. Condrea E. Membrane-active polypeptides from snake venom: cardiotoxins and haemocytotoxins.— *Experientia*, 1974, v. 30, № 2, p. 121—129.
3. Юкельсон Л. Я., Садыков Э., Сахибов Д. Н., Сорокин В. М. Действие «прямого» гемолитического фактора и фосфолипазы A<sub>2</sub> яда среднеазиатской кобры на эритроциты.— Биохимия, 1975, т. 40, вып. 4, с. 698—702.
4. Condrea E. Hemolytic affects of snake venoms.— In: Snake Venoms. / Lieed C.-Y., ed. Handbook of Expt. Pharmacol. Berlin — Heidelberg: Springer-Verlag, 1979, v. 52, № 4, p. 448—479.
5. Гришин Е. В., Сузих А. П., Адамович Т. Б., Овчинников Ю. А. Выделение, свойства и аминокислотная последовательность двух цитотоксинов из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana*.— Биорган. химия, 1976, т. 2, № 8, с. 1018—1034.
6. Сосфенов Н. И., Фейгин Л. А. Методика исследования биологических макромолекул в растворе методом рентгеновского малоуглового рассеяния.— Аппаратура и методы рентгеновского анализа, 1967, вып. 1, с. 197—209.
7. Щедрин Б. М., Фейгин Л. А. Учет коллимационной поправки при рассеянии рентгеновских лучей под малыми углами. Случай конечных размеров щелей.— Кристаллография, 1966, т. 11, № 2, с. 159—165.
8. Асадчиков В. Е., Малашкевич В. Н., Могилевский Л. Ю., Диков М. М., Егоров А. М., Осипов А. П. Об изменении формы форматдегидрогеназы при присоединении кофермента по данным рентгеновского малоуглового рассеяния.— Биорган. химия, 1980, т. 6, № 11, с. 1703—1706.
9. Guinier A., Fournet G. Small angle scattering of X-rays. N. Y.: 1955.
10. Каюшина Р. Л., Рольбин Ю. А., Фейгин Л. А. К вычислению объема макромолекул по данным рентгеновского малоуглового рассеяния.— Кристаллография, 1974, т. 19, № 6, 1161—1165.
11. Laggner P., Kratky O., Palm W. H., Holasek A. Röntgenkleinwinkeluntersuchungen an Lösungen von Schweineserum-Albumin bei verschiedenen PH-Werten.— Monatsch. Chemie, 1974, B. 102, S. 1729—1744.
12. Low B. W. The three dimensional structure of postsynaptic snake neurotoxins: consideration of structure and function.— In: Snake Venoms. Lieed C.-Y., ed. Handbook of Expt. Pharmacol. Berlin — Heidelberg: Springer-Verlag, 1979, v. 52, № 4, p. 248—266.

Поступила в редакцию  
9.XII.1980

### SMALL-ANGLE X-RAY SCATTERING DETERMINATION OF THE FORM AND SIZE FOR CYTOTOXIN Vc 1 FROM THE VENOM OF MIDDLE ASIAN COBRA

OIMATOV M., ARIPOV T. F., ASLANOV Kh. A., SADYKOV A. S.,  
ASADCHIKOV V. E., DEMBO A. T., YUKELSON L. Ya.

*Institute of Biorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Uzbek SSR, Tashkent;*  
*Institute of Crystallography, Academy of Sciences of the USSR, Moscow;*  
*Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Uzbek SSR, Tashkent*

By small-angle X-ray scattering the following parameters were determined for cytotoxin Vc 1 from the venom of Middle Asian cobra *Naja oxiana* Eichwäld: gyration radius  $R_g$   $11,6 \pm 0,5$  Å, molecular volume  $V$   $6200 \pm 600$  Å<sup>3</sup>, gyration radius of the cross-section  $R_q$   $5,5 \pm 0,3$  Å. A comparison of the experimental scattering curve with theoretical one for different models, revealed a good agreement for either elliptic cylinder (the ratio of half-axes and half-height 1:0,75:2), or triaxial ellipsoid (half-axes ratio 1:0,67:2,7). The calculated volumes for these models are in accord with the experimentally found value. A scattering curve for the triaxial ellipsoid fits better the experimental curve than that of the elliptic cylinder.