



УДК 577.112.4.088.53 : 543.422.27

ПОЛУЧЕНИЕ И ЭПР-ИССЛЕДОВАНИЕ СПИН-МЕЧЕНЫХ
ПРОИЗВОДНЫХ НЕЙРОТОКСИНА II *NAJA NAJA OXIANA*

*Уткин Ю. Н., Пашиков В. С., Плужников К. А.,
Курытов А. Б., Арсеньев А. С., Цетлин В. И.,
Быстров В. Ф., Иванов В. Т.*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина
Академии наук СССР, Москва*

После реакции нейротоксина II *Naja naja oxiana* с N-оксисукцинимидным эфиром 2,2,6,6-тетраметил-4-карбоксиметилпиперидин-1-оксила выделено шесть производных, содержащих по одной спиновой метке в молекуле. Анализ каждого из них (восстановление, карбоксиметилирование, триптический гидролиз, выделение и идентификация спин-меченого пептида) позволил установить положение меток: ϵ -аминогруппы остатков Lys¹⁵, Lys²⁵, Lys²⁶, Lys⁴⁴ и Lys⁴⁶, а также α -аминогруппа Leu¹. В результате реакции нейротоксина II с N-оксисукцинимидным эфиром 2,2,5,5-тетраметил-3-карбокспирролин-1-оксила и последующей хроматографии получены 10 дизайненных производных по остаткам лизина и проведена локализация меток. На основании зависимости выхода производных от условий реакции обсуждается связь между реакционной способностью аминогрупп и их микроокружением. Методом ЭПР для диспин-меченых производных пирролинового ряда по калибровочной кривой определены расстояния между метками, которые использованы для уточнения пространственной структуры нейротоксина в растворе.

Для выяснения пространственной структуры нейротоксина II (NT-II) из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* наряду с нативным токсином (его первичная структура представлена на схеме 1) исследованы его химически модифицированные производные [3–7]. Введение специфических меток позволило расширить круг используемых методов. Например, с помощью трифторацетилирования NT-II и спектроскопии ¹⁹F-ЯМР установлен ряд характерных черт укладки полипептидной цепи токсина [5].

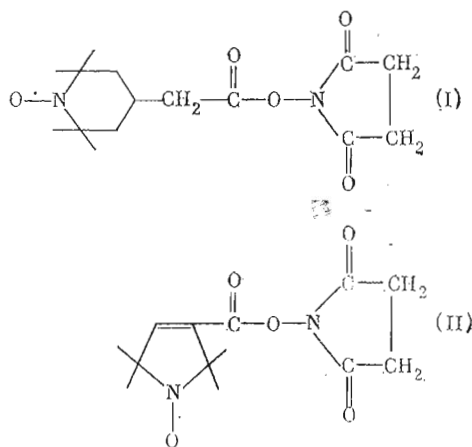
Настоящее сообщение посвящено получению серии спин-меченых производных NT-II, содержащих по одной или по две спиновые метки в различных участках молекулы. В мономеченых соединениях методами ¹H-ЯМР [6] и флуоресценции [7] определено расположение меток относительно ряда боковых цепей и установлена конформация центрального фрагмента молекулы [6]. Метод ЭПР использован для изучения топографии связывания моноспин-меченых производных с ацетилхолиновым рецептором [8], а также для определения расстояний между спиновыми метками в димеченых производных (см. ниже).

*Получение спин-меченых производных NT-II.
Зависимость между микроокружением и реакционной
способностью аминогрупп*

Спиновые метки планировали вводить по ϵ -аминогруппам лизина, поскольку их ацилирование, как было показано ранее [5], приводит к производным, в значительной степени сохраняющим биологическую активность и пространственные характеристики исходного нейротоксина. В качестве модифицирующих агентов использовали N-оксисукцинимидные эфиры 2,2,6,6-тетраметил-4-карбоксиметилпиперидин-1-оксила ((I), схема 2) и 2,2,5,5-тетраметил-3-карбокспирролин-1-оксила ((II), схема 2).

Для получения моноспин-меченых соединений реакцию с эфиром (I) проводили при недостатке реагента (2 экв. (I) на 6 аминогрупп NT-II).

Схема 2



Спин-меченые реагенты, использовавшиеся для модификации NT-II: N-оксисукцинимидные эфиры 2,2,6,6-тетраметил-4-карбоксиметилпиперидин-1-оксида (I) и 2,2,5,5-тетраметил-3-карбоксипирролин-1-оксида (II)

В этом случае с хорошим выходом образуется только одно из ожидаемых производных (меченное по Lys^{26*}), а два из них (меченные по α -аминогруппе и Lys⁴⁶) вообще не образуются (табл. 1). Поэтому было решено использовать 6M хлоргидрат гуанидина, одновременно уменьшив соотношение реагент:токсин до 1,1. После обессоливания реакционной смеси продукты реакции разделяли на колонке с биорексом 70 (рис. 1). При этом были получены продукты, содержащие две и более спиновых меток в молекуле (фракция 1), шесть моноспин-меченых соединений (фракции 2–7), а также непрореагировавший токсин (фракция 8) и выходящая рядом с ним фракция 9, не содержащая спиновой метки. В каждом из моноспин-меченых производных установлено положение включенной метки. Для этого пептиды, образующиеся после восстановления дисульфидных связей, карбоксиметилирования и триптического гидролиза, разделяли на колонке с сефадексом G-25sf (рис. 2). Наличие спиновой метки в пептидах определяли методом ЭПР.

После гель-фильтрации триптического гидролизата фракция 5 спиновая метка обнаруживается только в первом пике (рис. 2а), которому, по данным аминокислотного и N-концевого анализа (табл. 2), соответствует пептид 1–26. Такой пептид может образоваться только в случае блокирования ϵ -аминогруппы лизина в положении 15 (см. схему 1); следовательно, спиновая метка находится в этом положении.

При разделении гидролизата фракции 7 (рис. 1) сигнал иминоксильного радикала наблюдается только во втором пике (рис. 2б), который соответствует смеси пептидов 16–26 и 45–55. При деградации по Эдману (дансильный вариант) на втором шаге был обнаружен дидансиллизин, что означает отсутствие модификации по остатку лизина в положении 46. Наличие пептида 27–32 в триптическом гидролизате фракции 7 свидетельствует о том, что ϵ -аминогруппа остатка Lys²⁶ является свободной. Таким образом, фракция 7 содержит производное NT-II, селективно меченное по остатку Lys²⁵.

Наличие спиновой метки в пептиде 26–32 и отсутствие ее в остальных пептидах должно свидетельствовать о модификации остатка Lys²⁶. Такой пептид получен из триптического гидролизата фракции 4 (рис. 2г). В триптическом гидролизате фракции 3 (рис. 1) обнаруживается пептид с аминокислотной последовательностью 39–55, содержащий иминоксильный радикал (рис. 2в), что указывает на модификацию аминогруппы лизина-44.

* При нумерации по гомологичному ряду «коротких» нейротоксинов [9] нейротоксин II имеет делецию в положении 19, а остатки лизина находятся в положениях 15, 26, 27, 45 и 47.

Рис. 1. Разделение продуктов реакции NT-II с реагентом (I) на биорексе 70 (колонка 1×40 см) в градиенте аммоний-ацетатного буфера, pH 7,5; скорость элюирования 29 мл/ч

Рис. 2. Разделение продуктов триптического гидролиза восстановленных и карбоксиметилированных спин-меченых производных NT-II из фракций рис. 1: 5 (а), 2 и 7 (б), 3 (в), 4 (г) на сефадексе G-25 sf (колонка 0,3×130 см) в 0,1 М уксусной кислоте. Точкой отмечены пептидные фракции, имеющие спиновую метку. Цифрами указаны остатки пептидных фрагментов, содержащихся в отмеченной фракции

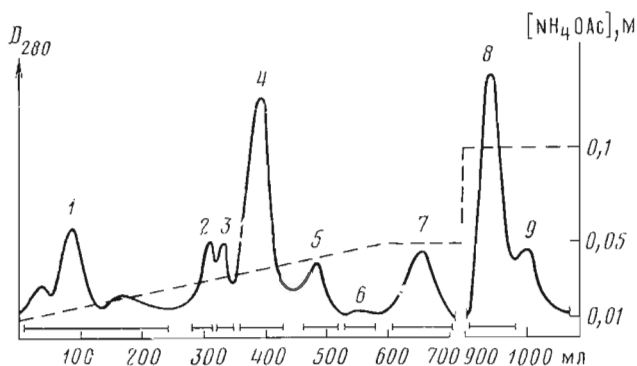


Рис. 1

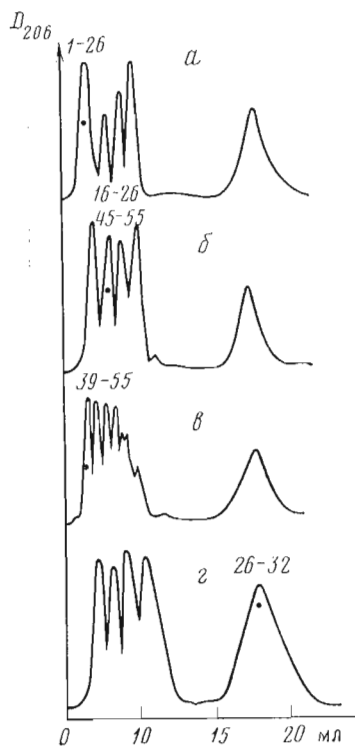


Рис. 2

Для локализации метки во фракции 2, триптический гидролизат которой, как и в случае фракции 7, содержит иминоксильный радикал в смеси пептидов 16—26 и 45—55 (рис. 2б, табл. 2), проводили определение первых трех аминокислот прямым методом Эдмана. Отсутствие в их числе лизина свидетельствует о модификации остатка Lys⁴³.

N-Концевой анализ восстановленного и карбоксиметилированного пептидного материала фракции 6 показал отсутствие N-дансиллейцина в гидролизате, что позволило сделать вывод о модификации α-аминогруппы N-концевого лейцина.

Для получения диспин-меченых производных проводили реакцию NT-II с 4,5 эквивалентами реагента (II). Это соотношение реагент — белок оказалось оптимальным — при меньших количествах реагента выход диспин-меченых производных крайне низок, а при более высоких возрастает доля производных, содержащих три и более меток. Разделение диспин-меченых производных проводили в две стадии. Сначала с помощью хроматографии на карбоксиметилцеллюлозе CM-32 (рис. 3) три фракции дипроизводных (2—4) отделяли от поли- и мономеченых соединений, а также от непрореагировавшего токсина (фракции 1, 5—8), затем каждую из них хроматографировали на колонке с биорексом 70 в условиях плавного линейного градиента молярности буфера (рис. 4).

Результаты локализации меток, приведенные в табл. 2, подтвердили однородность полученных производных. Исключение составляет фракция 3в (рис. 4), которая содержит 70% Lys²⁶ — Lys⁴⁶- и 30% Lys¹⁵ — Lys⁴⁶-производных.

Продукт модификации α-аминогруппы лейцина был получен с крайне низким выходом (~0,5%). На основании работы [10] можно было ожидать предпочтительной модификации этого остатка при pH 6,0 в присутствии хлоргидрата гуанидина, однако снижение pH привело лишь к уменьшению выходов спин-меченых производных по остаткам лизина (табл. 1).

Модификация NT-II в различных условиях (см. табл. 1) дает сведения о реакционной способности аминогрупп. В неденатурирующих условиях при pH 8,0 реакция с эфиром (I) приводит, как отмечалось выше, к пред-

Выходы моноспин-меченых производных NT-II (%)

Количество реагента, моль/моль токсина	pH	Модифицированный остаток					
		Leu ¹	Lys ¹⁵	Lys ²⁵	Lys ²⁶	Lys ⁴⁴	Lys ⁴⁶
2,0	8,0	—	1	3	13	3	—
1,1 *	8,1	0,5	2,4	6,0	13,6	3,4	2,9
1,1 *	6,0	—	2,1	5,6	9,8	3,1	—
1,1 *	5,0	—	1,3	3,5	5,2	2,7	—
4,5 **	8,0	—	0,3	—	3,5	3,3	3,0

* Реакция в присутствии 6 М хлоридрата гуанидина.

** Реакция с эфиром (II), в остальных случаях реакция с эфиром (I).

Таблица 2

Локализация спиновых меток и биологическая активность производных NT-II, модифицированных по лизиновым остаткам

Номер фракции	Пептиды, содержащие спиновые метки	N-Концевая аминокислота	Номер модифицированного остатка Lys	LD ₅₀ ^{1*} , мкг/кг
52*	1-26	Leu	15	110
72*	16-26, 45-55	Thr, Val	25	85
42*	26-32	^{4*}	26	300
32*	39-55	Gly	44	150
22*	16-26, 45-55	Thr, Val	46	240
2a3*	39-55	Gly	44, 46	^{4*}
3б3*	39-55, 26-32	Gly, ^{4*}	44, 26	430
3в3*	45-55, 26-32	^{4*}	46, 26	^{4*}
3г3*	1-25, 45-55	Leu, Val	15, 46	^{4*}
3д3*	45-55, 16-26	Val, Thr	46, 25	^{4*}
3е3*	39-55, 16-26	Gly, Thr	44, 25	^{4*}
3ж3*	1-25, 39-55	Leu, Gly	15, 44	^{4*}
4з3*	1-25, 26-32	Leu, ^{4*}	15, 26	^{4*}
4и3*	16-32	^{4*}	25, 26	^{4*}
4к3*	1-26	Leu	15, 25	^{4*}

1* LD₅₀ токсина NT-II 60 мкг/кг.

2* Рис. 1.

3* Рис. 3, 4.

4* Определение не проводилось.

почтительному образованию Lys²⁶-производного, а в реакции с ацетокси-сукцинимидом [5] все остатки лизина проявляют близкую реакционную способность. Таким образом, «суперреактивность» остатка Lys²⁶, отмечавшаяся ранее для гомологичных нейротоксинов при дансифировании и тринитрофенилировании [11, 12], касается лишь реагентов, содержащих объемные гидрофобные группировки. Даже сравнительно небольшие изменения в размерах таких группировок, как показывают опыты с использованием эфиров (I) и (II) (табл. 1), существенно влияют на характер модификации.

Данные о реакционной способности аминогрупп следует сопоставить с имеющимися сведениями об их микроокружении, полученными спектральными методами [5, 7, 8]. Так, спиновая метка в положении Lys⁴⁴ является самой подвижной по сравнению с остальными производными и она доступна для парамагнитного зонда [8], а по данным ¹⁹F-ЯМР около трифторацетильной группы, связанной с этим остатком, нет титрующихся группировок [5]. Таким образом, тот факт, что реакционная способность этой аминогруппы почти не зависит от характера и избытка реагентов, присутствия хлоридрата гуанидина или pH (в интервале 5-8), указывает на ее экспонированность в нативном NT-II и высокое значение pK. Напротив, аминогруппы остатков Lys²⁵ и Lys²⁶ находятся в «тесном» микроокружении: связанные с ними спиновые метки имеют ограниченную подвижность [8] и сближены на расстояние 0,4-0,6 нм с пидольными кольцами остатков Trp²⁷ и Trp²⁸ [7]. В свете этих данных высокая реакционная способность аминогруппы остатка Lys²⁶ по отношению к гидро-

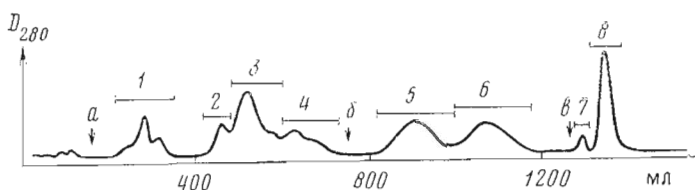


Рис. 3. Разделение продуктов реакции NT-II с реагентом (II) на CM-целлюлозе CM-32 (колонка 1,5×40 см): а — линейный градиент концентрации ацетата аммония от 0,05 до 0,1 M, рН 5,5; б — 0,1 M ацетат аммония, рН 5,5; в — 0,2 M ацетат аммония, рН 6,2. Скорость элюирования 48 мл/ч. Отмечены выделенные фракции

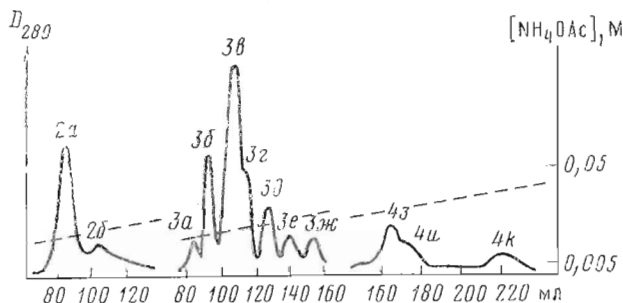


Рис. 4. Разделение диспипин-меченых производных NT-II (фракции 2—4 рис. 3) на биорексе 70 (колонка 1×30 см) в градиенте концентрации аммоний-ацетатного буфера (рН 7,0). Скорость элюирования 13 мл/ч

фобным реагентам может объясняться их средством к этому участку молекулы и, вероятно, относительно низким значением ее pK (вследствие гидрофобности окружения и сближенности с аминогруппой лизина-46). Фактором, сближающим реакционную способность ϵ -аминогруппы остатка Lys²⁵, может быть пространственная близость карбоксильной группы с pK 1,3 [5].

В табл. 3 приведены выходы диспипин-меченых производных. С наибольшим выходом образуются дипроизводные по тем остаткам лизина, которым отвечает наиболее высокий выход монопроизводных — Lys⁴⁶, Lys²⁶ и Lys⁴⁴. Хотя моноспипин-меченое производное по остатку Lys²⁵ в реакции с эфиром (II) не было обнаружено, тем не менее удалось выделить диспипин-меченые производные, содержащие этот остаток. Очевидно, реакционная способность аминогруппы остатка Lys²⁵ возрастает при модификации других остатков лизина. В этой связи следует упомянуть локальные конформационные изменения, обнаруженные при сравнении спектров ¹H-ЯМР эрабутоксина *b* и его моноацетильных производных [13]; в той же работе показано, что N-концевая аминогруппа имеет высокое pK — 9,1 (для NT-II — 9,2 [14]), тогда как pK лизина-27 (соответствующего Lys²⁶ в NT-II) имеет сравнительно низкое значение (9,7), а боковая цепь этого остатка характеризуется ограниченной подвижностью, что хорошо согласуется с нашими результатами.

Рассмотренные выше данные свидетельствуют, что высокая реакционная способность того или иного аминокислотного остатка в белке не всегда означает его экспонированность — примером служит аминогруппа остатка Lys²⁶ NT-II. В этой связи уместно напомнить неудачную попытку построения модели пространственной структуры нейротоксина (предсказание замаскированных и экспонированных участков) на основе данных химической модификации [15]. С другой стороны, исследования микроокружения остатков с использованием ковалентных меток или зондов также имеют ограничения. Например, для производного NT-II, в котором одновременно ацилированы все аминогруппы, ряд доступности трифторацетильных групп к спиновому зонду не полностью согласуется с данными для моноспипин-меченых производных (ср. [5] и [8]). Очевидно, только

**Выходы диспин-меченых производных NT-II,
модифицированных по лизиновым остаткам**

Номера модифицированных остатков Lys	Выход, %	Номера модифицированных остатков Lys	Выход, %
46 и 44	2,0	25 и 44	0,5
44 и 26	1,7	15 и 44	0,3
46 и 26	2,7	15 и 26	1,2
15 и 46	1,3	25 и 26	0,5
25 и 46	0,9	15 и 25	0,7

при совместном использовании химических и спектральных методов можно получить адекватные представления о топографии поверхности нейротоксина: степени экспонирования и реакционной способности группировок — потенциальных участников взаимодействия с ацетилхолиновым рецептором.

Как видно из табл. 2, моноспин-меченые производные NT-II являются биологически активными, в большей или меньшей степени сохраняя токсичность исходного нейротоксина. Как и при ацетилировании [5], наибольшее уменьшение токсичности происходит при блокировании зарядов ε-аминогрупп остатков Lys²⁶ и Lys⁴⁶. Различие состоит в том, что если при ацетилировании лизина-44 токсичность не менялась, то при введении в это положение объемной спиновой метки токсичность уменьшается в 2,5 раза. В связи с тем, что диспин-меченые производные были получены в малых количествах, испытания на токсичность были проведены только для одного из них — Lys²⁶ — Lys⁴⁴-производного. Одновременное блокирование двух аминогрупп приводит к более заметному падению токсичности, чем блокирование каждой из них; тем не менее соответствующее производное сохраняет 14% токсичности NT-II.

Данные ¹H-ЯМР показали, что моноспин-меченые производные NT-II в основном сохраняют конформацию природного соединения [6]. Моно- и диспин-меченые производные имеют сходные с NT-II спектры КД. Таким образом, эти соединения являются адекватными объектами для изучения пространственной структуры нейротоксинов и механизма их действия.

*Определение расстояний между иминоксильными радикалами
в диспин-меченых производных NT-II*

Ни в одном из диспин-меченых производных NT-II не наблюдалось обменное спин-спиновое взаимодействие в растворе. Оценка величины диполь-дипольного взаимодействия методом ЭПР в застеклованных при низкой температуре растворах позволяет определить расстояние между иминоксильными радикалами и тем самым получить представление о взаимном расположении отдельных участков молекулы. Мы воспользовались методом [16], основанным на эмпирической зависимости отношения суммы интенсивностей крайних компонент спектра ЭПР к интенсивности центральной компоненты d_1/d (см. рис. 5) от расстояния между радикалами. Практически более удобным оказался параметр $\Delta = \frac{d_1}{d} - \left(\frac{d_1}{d}\right)_0$, где $(d_1/d)_0$ — значение d_1/d для сильно разбавленного застеклованного раствора монаорадикала, в котором можно пренебречь диполь-дипольным взаимодействием между неспаренными электронами. Ранее была определена эмпирическая зависимость Δ от расстояния между электронами для бирадикалов пиперидинового ряда [17]. Поскольку параметр d_1/d зависит не только от величины диполь-дипольного взаимодействия, но и от строения иминоксильного радикала [17], предложенная зависимость, по-видимому, непригодна для анализа расстояний между метками пирролинового ряда в диспин-меченых производных NT-II. Нами исследована концентрационная зависимость параметра d_1/d для монаорадикала N-(2,2,5,5-тетра-

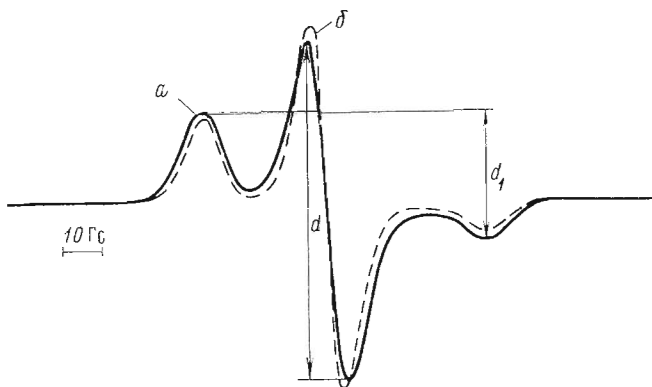


Рис. 5. Спектры ЭПР диспин-меченого производного по остаткам лизина-26 и -44 NT-II (а) и монорадикала N-(2,2,5,5-тетраметил-3-карбонилпирролин-1-оксил)глицина (б), застеклованных при 77 К в 50% водно-глицериновой матрице. Концентрация $5 \cdot 10^{-4}$ М. Стрелками показана интенсивность компонент сигнала d и d_1

метил-3-карбонилпирролин-1-оксил)глицина и получена калибровочная кривая для определения расстояний в диспин-меченых производных NT-II (рис. 6). При построении кривой предположено, что в спектрах ЭПР бирадикалов (разбавленные растворы) и в растворах монорадикала равные значения d_1/d реализуются при $r=0,53 \cdot \bar{r}$, где r и \bar{r} — расстояния между иминоксильными радикалами в бирадикале и в растворе монорадикала соответственно [17]. На основании полученной кривой определены расстояния между радикалами в NT-II, приведенные в табл. 4. Часть из них оказывается несколько выше расстояний, определенных ранее [6], когда имелось меньшее число точек на экспериментальной кривой и предполагалась линейная зависимость параметра Δ^{-1} от расстояния между неспаренными электронами (по аналогии с работой [21]). Как видно из рис. 6, эта зависимость имеет нелинейный характер, однако может быть сведена к линейной в координатах $r=f(\ln \Delta^{-1})$.

Для $\text{Lys}^{15}-\text{Lys}^{25}$ - и $\text{Lys}^{25}-\text{Lys}^{46}$ -производных экспериментально измеренная величина Δ составляет 0,02, что сопоставимо с ошибкой измерения ($\sim 0,01$) отношения d_1/d . Поэтому оценка расстояний между этими метками недостаточно надежна ($\geq 2,6$ нм). Хотя расстояния между каждой парой спиновых меток измерены для различных диспин-меченых производных NT-II, они не противоречат друг другу и позволяют построить модель пространственного расположения меток в молекуле (рис. 7; возможен также зеркальный вариант). Этот факт свидетельствует о том, что конформация NT-II в значительной степени сохраняется при модификации любой пары остатков лизина.

Наиболее короткое расстояние между спиновыми метками на остатках Lys^{26} и Lys^{46} (1,5 нм) подтверждает качественный вывод о пространственной близженности этих боковых цепей, полученный ранее при исследовании серии селективно ацетилированных и трифторацетилированных производных NT-II [5]. Интересно, что, по данным ^{19}F -ЯМР [18], из всех расстояний от спин-метки на остатке Lys^{26} до трифторацетильных групп на других остатках лизина наиболее коротким является расстояние до трифторацетильной группы на лизине-46. Относительно большое расстояние между метками на боковых цепях соседних по аминокислотной последовательности остатков Lys^{25} и Lys^{26} согласуется с β -структурой этого участка полипептидной цепи [19].

Короткие гомологичные нейротоксины характеризуются значительным подобием пространственной структуры, отличающейся высокой стабильностью. Это обстоятельство позволяет сопоставить данные, полученные при исследовании различных нейротоксинов. Почти все измеренные в настоящей работе расстояния между неспаренными электронами в

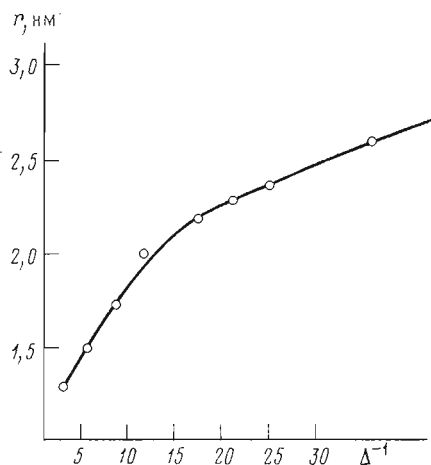


Рис. 6

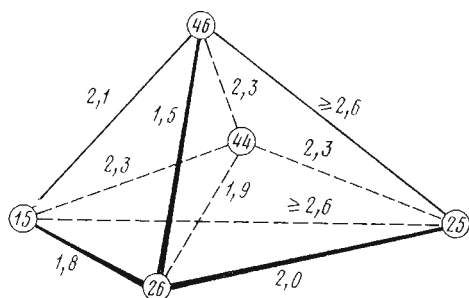


Рис. 7

Рис. 6. Зависимость параметра Δ^{-1} спектров ЭПР от расстояния между неспаренными электронами меток пирролинового ряда для бирадикалов

Рис. 7. Модель пространственного расположения меток в диспепти-меченых производных NT-II

диспепти-меченых производных NT-II могут быть реализованы на модели пространственной структуры этой молекулы (рис. 8), построенной по координатам кристаллического эрабутоксина *b* [19]. При этом спиновые метки на остатках Lys²⁵ и Lys²⁶ располагали относительно центральной петли молекулы токсина (остатки 24–39) в соответствии с дашными работами [6], оставив ориентацию боковых цепей остатков Lys¹⁵, Lys²⁶ и Lys⁴⁶ такой же, как в кристалле. Положение C^β-атомов боковых цепей остатков Lys²⁵ и Lys⁴⁴ было принято таким же, как положение соответствующих атомов гомологичных остатков (His²⁶ и Thr⁴⁵). В частности, можно отметить хорошее соответствие расстояния между спиновыми метками в положениях Lys²⁶ и Lys⁴⁶ и расстояния между положительно заряженными аминогруппами этих остатков (1,17 нм по оценке в работе [20]). Расстояния от метки на остатке Lys¹⁵ до остальных меток, однако, отличаются от определенных экспериментально методом ЭПР, если на модели установить такую же, как в кристалле, ориентацию боковой цепи остатка Lys¹⁵. Эти расстояния удастся реализовать лишь при изменении расположения боковой цепи лизина-15, приблизив ее к спиновой метке на остатке Lys⁴⁶. Наблюдаемые расхождения могут объясняться также различиями в распо-

Таблица 4

Расстояния между спин-метками в диспепти-меченых производных NT-II, модифицированных по лизинным остаткам

Номера спин-меченых остатков Lys	Δ^{-1}	Расстояние между метками, нм			
		ЭПР	¹⁹ F-ЯМР * [18]	Рентген **	
				[19]	[20]
15, 25	50	≥2,6	—	—	—
15, 26	10	1,8	1,35±0,06	1,51	1,08
15, 44	25	2,3	—	—	—
15, 46	20	2,1	—	2,03	—
25, 26	14,3	2,0	1,25±0,5	—	—
25, 44	25	2,3	—	—	—
25, 46	50	≥2,6	—	—	—
26, 44	11,1	1,9	1,45±0,07	—	—
26, 46	5,9	1,5	1,02±0,05	0,74	1,17
44, 46	25	2,3	—	—	—

* Расстояния от спиновой метки на остатке Lys²⁶ до трифторацетильной группы на соответствующем остатке лизина.

** Расстояния между аминогруппами.

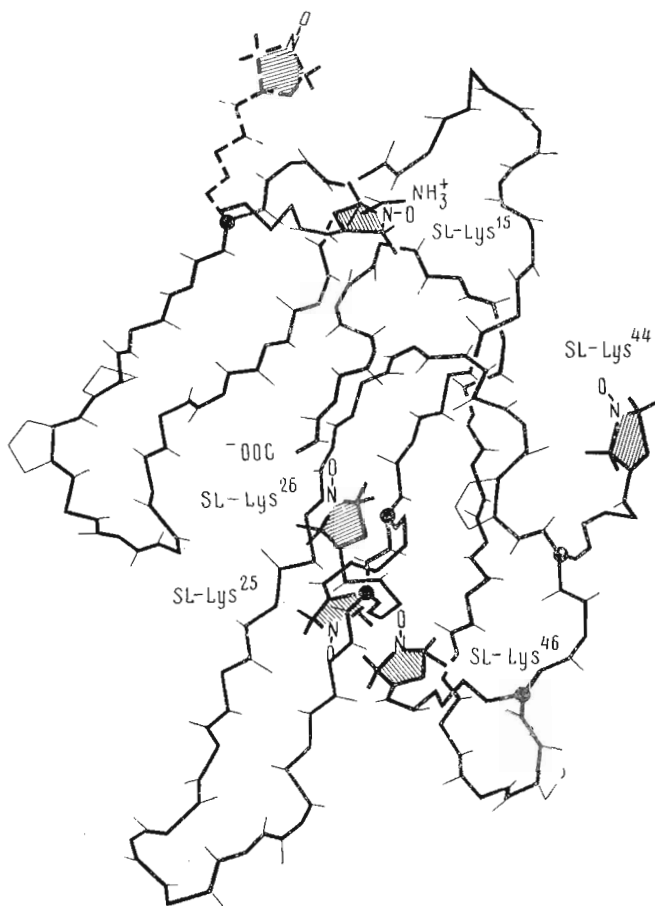


Рис. 8. Расположение спиновых меток (SL-Lys) в модели пространственной структуры NT-II, построенной по координатам рентгеноструктурного анализа эрабутоксина *b* [19]. Пунктиром указано расположение боковой цепи остатка Lys¹⁵ в эрабутоксине *b*

ложении петли, содержащей этот остаток, относительно других петель в растворе (данные ЭПР для NT-II) и в кристалле (рентгеноструктурные данные для эрабутоксина *b*). Проведенные в недавнее время ¹H-ЯМР исследования эрабутоксина *b* [22] выявили различия в пространственном окружении некоторых остатков, находящихся в рассматриваемой петле (в частности, His⁷) в кристаллическом состоянии и в растворе. Эти данные авторы объясняют различиями в расположении первой петли относительно двух других в растворе и кристалле.

Таким образом, полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют, что для коротких нейротоксинов в растворе в основном сохраняется пространственная структура, определенная для эрабутоксина *b* в кристалле [19]. Следует отметить, что, вероятно, в растворе петля, включающая остаток Lys¹⁵, ориентирована относительно двух других несколько иначе, чем в кристалле.

Экспериментальная часть

N-Оксисукцинимидные эфиры (I) и (II) получены как описано в работах [23] и [24] соответственно.

N-(2,2,5,5-Тетраметил-3-карбонилпирролин-1-оксил) глицин. К 362 мг (1,97 ммоль) 2,2,5,5-тетраметил-3-карбокспирролин-1-оксила в 8 мл хлороформа при охлаждении в ледяной бане и перемешивании добавляли

охлажденный до 0° С раствор 432 мг (2,1 ммоль) дициклогексилкарбодиимида в 2 мл хлороформа и перемешивали еще 10 мин. К полученной смеси добавляли раствор, приготовленный из 267 мг (2,1 ммоль) хлоргидрата метилового эфира глицина и 280 мкл (2,1 ммоль) триэтиламина в 5 мл хлороформа. Через 20 ч (22° С) отфильтровывали мочевины, раствор в хлороформе промывали 3% раствором триэтиламина, водой, 5% лимонной кислотой, два раза насыщенным раствором хлористого натрия и снова водой. Органическую фазу высушивали CaCl₂ и упаривали. Остаток кристаллизовали из смеси этилацетат — гексан. Получили 221,4 мг (0,86 ммоль) метилового эфира N-(2,2,5,5-тетраметил-3-карбонилпирролин-1-оксил)глицина, выход 42%. Т. пл. 141—142°, *m/z* 256. Полученное вещество кипятили 2 мин в 2 мл 20% раствора едкого кали. Затем добавляли воду, подкисляли до pH 3 лимонной кислотой и экстрагировали этилацетатом. Водный раствор насыщали NaCl и вновь экстрагировали этилацетатом; этилацетатные вытяжки упаривали, остаток растворяли в воде, отфильтровывали нерастворимый осадок и лиофилизировали, получая гигроскопичную стеклообразную массу. Выход 121 мг (26%). *R_f* 0,63 (ТСХ на силикагеле, *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4:1:1), *m/z* 241.

2,2,5,5-Тетраметил-3-карбокспирролин-1-оксил производные NT-II. К раствору 150 мг (21 мкмоль) NT-II в 10 мл 0,5 М трис-HCl-буфера, pH 8,0, добавляли 30 мг (96 мкмоль) эфира (II) в 2 мл тетрагидрофурана и перемешивали 20 ч при 20° С. После обессоливания на колонке с сефадексом G-10 (2,5×60 см), уравновешенной 0,05 М аммоний-ацетатным буфером, pH 4,5, белковую фракцию лиофилизировали и хроматографировали на колонке с CM-целлюлозой (рис. 3). Диспин-меченые производные хроматографировали на бюрексе 70 (рис. 4), а моноспин-меченые — на колонке с этим же ионообменником в линейном градиенте (от 0,01 до 0,05 М) аммоний-ацетатного буфера, pH 7,5.

2,2,6,6-Тетраметил-4-карбоксиметилпиперидин-1-оксилпроизводные NT-II. К 100 мг (14,5 мкмоль) NT-II в 10 мл 0,2 М трис-HCl-буфера, pH 8,0, содержащего 6 М хлоргидрат гуанидина, добавляли 4,5 мг (14,5 мкмоль) эфира (I) в 0,15 мл диоксана и перемешивали 20 ч при 20° С. Реакцию при pH 5,2 или 6,0 проводили при таком же соотношении реагирующих веществ и денатурирующего реагента в 0,2 М натрий-ацетатном буфере. После обессоливания реакционной смеси на сефадексе G-10 в 0,1 М уксусной кислоте проводили хроматографическое разделение белковой фракции на бюрексе 70 (рис. 1).

Количество включившихся спиновых меток определяли по увеличению отношения поглощения D_{250}/D_{280} , так как нитроксильные радикалы имеют полосу поглощения при ~250 нм ($\epsilon \approx 2000$ [25]). Для нативного NT-II это соотношение равно 0,50—0,55, каждая включившаяся метка увеличивала его на ~0,17. Правильность такой оценки подтверждена сравнением интенсивностей ЭПР-спектров полученных производных NT-II и стандартных растворов свободных меток.

Восстановление, карбоксиметилирование, триптический гидролиз спин-меченых производных и разделение пептидов проводили по методике, описанной в работе [2], с теми отличиями, что использовали меньшие количества вещества (~0,4 мг) и меньшие колонки, а выход пептидов детектировали на Uvicord III (Швеция) при 206 нм (рис. 2).

N-Концевые аминокислоты определяли дансильным методом. Аминокислотный анализ кислотных гидролизатов (6 н. HCl, 110° С, 24 ч) пептидов проводили на аминокислотном анализаторе Durrum D-500. Спектры КД снимали на дихрографе Jobin Yvon III при 22—26° С в натрий-фосфатном буфере, pH 7,0, концентрация белка 10^{-5} — 10^{-4} М.

Спектры ЭПР сняты на приборе Varian E 109 (9 ГГц) при температуре 77 К с использованием низкой энергии микроволнового поля (0,2 мВт) для предотвращения насыщения сигналов. Концентрация диспин-меченых производных NT-II в водно-глицериновом (1:1) растворе составляла $\sim 8 \cdot 10^{-5}$ М. Концентрацию N-(2,2,5,5-тетраметил-3-карбонилпирролин-1-оксил)глицина в водно-глицериновых (1:1) растворах определяли мето-

дами ЭПР (двойное интегрирование) и ЯМР с использованием в качестве стандартов 2,2,5,5-тетраметил-3-карбоксихиреин-1-оксила и триптофана соответственно.

Авторы выражают благодарность И. Н. Тележинской за определение N-концевых аминокислот, В. П. Мальковой за определение токсичности полученных препаратов, Л. Б. Сенявиной за съемку спектров КД, Т. В. Баботину за изготовление кварцевого дьюара для съемки спектров ЭПР при низких температурах и В. Н. Майорову за помощь в обработке спектров ЭПР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Grishin E. V., Sukhikh A. P., Lukyanchuk N. N., Slobodyan L. N., Lipkin V. M., Ovchinnikov Yu. A., Sorokin V. M. FEBS Lett., 1973, v. 36, № 1, p. 77-78.
2. Arnberg H., Eaker D., Fryklund L., Karlsson E. Biochim. et biophys. acta, 1974, v. 359, № 2, p. 222-232.
3. Arseniev A. S., Balashova T. A., Utkin Yu. N., Tsetlin V. I., Bystrov V. F., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. Eur. J. Biochem., 1976, v. 71, № 2, p. 595-606.
4. Арсеньев А. С., Сурин А. М., Уткин Ю. Н., Цетлин В. И., Быстров В. Ф., Иванов В. Т., Овчинников Ю. А. Биооргани. химия, 1978, т. 4, № 2, с. 197-207.
5. Tsetlin V. I., Arseniev A. S., Utkin Yu. N., Gurevich A. Z., Senyavina L. B., Bystrov V. F., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. Eur. J. Biochem., 1979, v. 94, № 2, p. 337-346.
6. Ivanov V. T., Tsetlin V. I., Karlsson E., Arseniev A. S., Utkin Yu. N., Pashkov V. S., Surin A. M., Pluzhnikov K. A., Bystrov V. F. In: Natural Toxins/Eds Eaker D., Wadstrom T. Oxford - New York: Pergamon Press, 1980, p. 523-530.
7. Сурин А. М., Уткин Ю. Н., Плужников К. А., Ефремов Е. С., Цетлин В. И. Биооргани. химия, 1981, т. 7, № 3, с. 342-356.
8. Tsetlin V. I., Karlsson E., Arseniev A. S., Utkin Yu. N., Surin A. M., Pashkov V. S., Pluzhnikov K. A., Ivanov V. T., Bystrov V. F., Ovchinnikov Yu. A. FEBS Lett., 1979, v. 106, № 1, p. 47-52.
9. Karlsson E. In: Handbook of Experimental Pharmacology/Ed. Lee C. Y. Berlin: Springer Verlag, 1979, v. 52, p. 159-212.
10. Мирошников А. И., Демьяшин Е. Я., Куделин А. Б., Овчинников Ю. А. Биооргани. химия, 1975, т. 1, № 12, с. 1702-1706.
11. Chicheportiche R., Rochat C., Sampieri F., Lazdunski M. Biochemistry, 1972, v. 11, № 9, p. 1681-1690.
12. Chang C. C., Yang C. C., Nakai K., Hayashi K. Biochim. et biophys. acta, 1971, v. 251, № 2, p. 334-344.
13. Inagaki F., Tamiya N., Miyazawa T. Eur. J. Biochem., 1980, v. 109, № 1, p. 129-138.
14. Bystrov V. F., Ivanov V. T., Okhanov V. V., Miroshnikov A. I., Arseniev A. S., Tsetlin V. I., Pashkov V. S., Karlsson E. In: Advances in solution chemistry/Eds Bertini I., Lunazzi L., Dei A. New York - London: Plenum Press, 1981, p. 231-249.
15. Ryden L., Gabel D., Eaker D. Int. J. Pept. Protein Res., 1973, v. 5, № 4, p. 261-272.
16. Кокорин А. И., Замараев К. И., Григорян Г. Л., Иванов В. П., Розанцев Э. Г. Биофизика, 1972, т. 17, № 1, с. 34-41.
17. Кокорин А. И. Измерение расстояний между спиновыми метками как метод изучения строения макромолекул и твердых растворов: Автореф. дис. ... канд. физ. наук. М.: Ин-т химической физики АН СССР, 1974, с. 24.
18. Arseniev A. S., Utkin Yu. N., Pashkov V. S., Tsetlin V. I., Ivanov V. T., Bystrov V. F., Ovchinnikov Yu. A. FEBS Lett., 1981, v. 136, № 2, p. 269-274.
19. Kimball M. R., Sato A., Richardson J. S., Rosen L. S., Low B. W. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1979, v. 88, № 3, p. 950-959.
20. Tsernoglou D., Petsko G. A., Hudson R. A. Mol. Pharmacol., 1978, v. 14, p. 710-716.
21. Пармон В. Н., Кокорин А. И., Жидомиров Г. М. Стабильные бирадикалы. М.: Наука, 1980, с. 127-131.
22. Inagaki F., Tamiya N., Miyazawa T., Williams R. J. P. Eur. J. Biochem., 1981, v. 118, № 3, p. 621-625.
23. Reissmann S., Arold H., Filatova M. P., Reutova T. O., Ivanov V. T. Z. Chem., 1975, B. 15, № 2, S. 399.
24. Hoffman B. M., Schofield P., Rich A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1969, v. 62, № 4, p. 1195-1202.
25. Briere R., Lemair H., Rassat A. Bull. Soc. chim. France, 1965, № 11, p. 3272-3290.

Поступила в редакцию
14.IX.1982
После доработки
20.X.1982

PREPARATION AND EPR STUDIES OF NEUROTOXIN II *NAJA NAJA OXIANA*
SPIN LABELED DERIVATIVES

UTKIN Yu. N., PASHKOV V. S., PLUZHNIKOV K. A., KURYATOV A. B.,
ARSENIEV A. S., TSETLIN V. I., BYSTROV V. F., IVANOV V. T.

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

After neurotoxin II *Naja naja oxiana* reaction with N-hydroxysuccinimidyl 2,2,6,6-tetramethyl-4-carboxymethylpiperidine-1-oxyl, six derivatives were isolated, each containing one spin label. Their analysis (reduction, carboxymethylation, tryptic hydrolysis, isolation and identification of the spin labeled peptide) allowed to localize the label position: the ϵ -amino groups of Lys¹⁵, Lys²⁵, Lys²⁶, Lys⁴⁴, Lys⁴⁶, and α -amino group of Leu¹. The neurotoxin II reaction with N-hydroxysuccinimidyl 2,2,5,5-tetramethyl-3-carboxypyrrolin-1-oxyl followed by chromatography afforded 10 derivatives, each having two labeled lysine residues, wherein the position of modified residues was determined. The reactivity and microenvironment of amino groups are discussed basing on the dependence between the reaction conditions and yields. For di-spin labeled derivatives of the pyrroline series, the inter-label distances were determined by EPR from the standard curve and used for refinement of the neurotoxin conformation in solution.