



УДК 577.322.53:591.145.2-812.62:543.42

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙРОТОКСИНОВ ДЛИННОГО ТИПА  
ИЗ ЯДА *NAJA NAJA SIAMENSIS*  
И *NAJA NAJA OXIANA*  
МЕТОДАМИ КРУГОВОГО ДИХРОИЗМА И ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Сурин А. М., Плужников К. А., Уткин Ю. Н.,  
Карлссон Е. \*, Цетлин В. И.

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

Шаров В. А.

Институт биофизики Минздрава СССР, Москва

Методами КД и флуоресценции исследованы конформация нейротоксинов длинного типа из яда змей *Naja naja siamensis* (STX) и *Naja naja oxiana* (NT-I), а также микроокружение остатков триптофана в этих токсинах и их производных, модифицированных по лизиновым остаткам. Для STX из КД-спектров рассчитаны вклады регулярных форм во вторичную структуру белка в интервале pH 2–6,5. Ионизация остатка His<sup>22</sup> в STX (pK 5,4–5,6) приводит к конформационному переходу, при этом относительное содержание регулярных форм изменяется незначительно. Состояние ионизации имидазольного кольца влияет на микроокружение инвариантного Trp<sup>29</sup>. Для NT-I, имеющего единственный гистидиновый остаток в С-концевом фрагменте, не обнаружено конформационных изменений при титровании имидазольной группы. Введение дансильных меток по остаткам Lys<sup>39</sup> и Lys<sup>60</sup> в NT-I не влияет на нативную конформацию нейротоксина. Расстояние от флуоресцентных меток до любого из двух триптофановых остатков не менее 1,0 нм. Полученные данные о конформации STX и NT-I свидетельствуют о том, что структура STX в кристалле может быть принята за основу при изучении пространственного строения нейротоксинов длинного типа в растворе.

Нейротоксины из яда змей, действующие на ацетилхолиновый рецептор постсинаптической мембраны, подразделяют на короткие (60–62 аминокислотных остатка, 4 дисульфидные связи) и длинные (71–74 остатка, 5 дисульфидных связей) [1]. Значительная гомология аминокислотной последовательности токсинов этих двух типов, сходный характер их биологического действия позволяют предполагать подобие основных черт их пространственной организации. До последнего времени наиболее детальная информация о структуре в растворе и кристалле была получена для нейротоксинов короткого типа. Рентгеноструктурный анализ длинного токсина из яда *Naja naja siamensis* (STX) [2] показал, что укладка его полипептидной цепи имеет сходство с найденной для эрабутоксина [3], являющегося представителем токсинов короткого типа. Исследования методом ЯМР нескольких нейротоксинов длинного типа [4–6] и их химически модифицированных производных [7] подтверждают, что ход полипептидной цепи и расположение функционально важных остатков исследованных токсинов в растворе соответствуют в основных чертах той картине, которая была получена для STX в кристалле. Следует, однако, отметить, что кристаллы STX были выращены при pH 2,0–2,8 из водного раствора, содержащего 75% 2-метил-2,4-пентандиола. Кристаллизация гомологичного нейротоксина I из яда *Naja naja oxiana* (NT-I) из ацетатного буфера, содержащего изопропанол, сопровождалась, по данным КР-спектроскопии [8], изменением конфигурации по крайней мере одной из дисульфидных связей. Недавно показано, что в STX [6] и токсине В *Naja naja* [9] в интервале pH 4,5–7,5 происходит конформационный

\* Институт биохимии, Уппсала, Швеция.



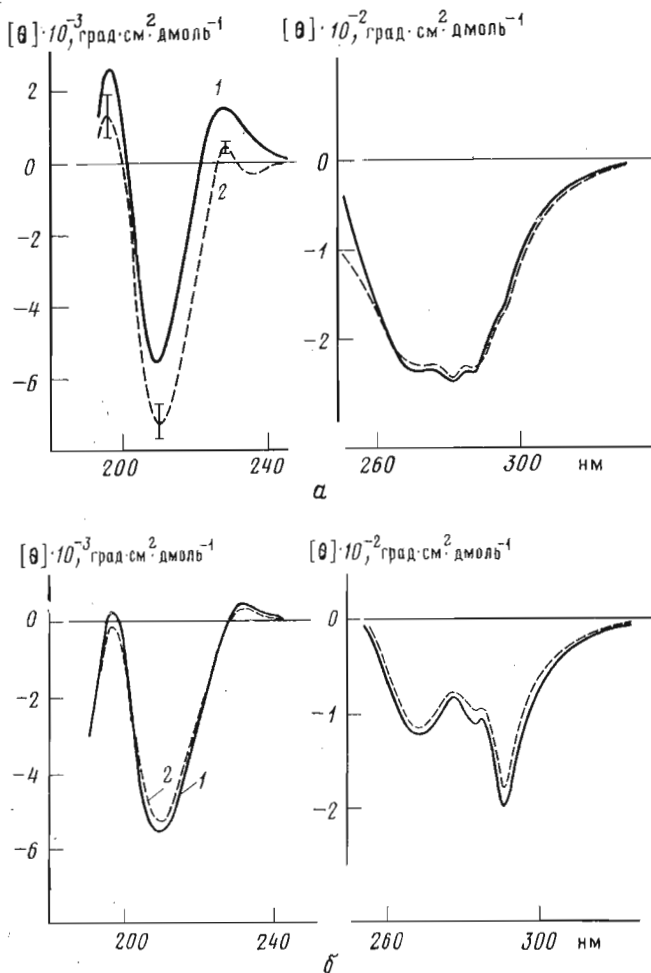


Рис. 2. Спектры КД STX (а) и NT-I (б) при pH 7,5 (1) и 4,0 (2). Концентрации белков 1 мг/мл в 0,1 М NaCl

переход, причиной которого в обоих случаях является ионизация боковой цепи единственного гистидинового остатка.

В данной работе методами КД и флуоресценции изучено влияние pH раствора на конформацию STX и NT-I. Первичная структура этих токсинов, а также их производных, в которых в определенные участки молекул введены ацетильная группа, спиновая или флуоресцентная метки, представлены на рис. 1. Сопоставление параметров флуоресценции нативных нейротоксинов и их производных позволило более детально охарактеризовать микроокружение остатков триптофана.

**КД-спектры STX и NT-I.** Спектры STX были получены в интервале pH 2–7,5, а для NT-I — 4–7,5 (рис. 2). Для STX нижней границей было выбрано то значение pH, при котором ранее исследовалась структура этого белка в кристалле [2]. В диапазоне pH 2,0–7,5 спектр ароматических хромофоров (250–310 нм) STX не изменяется, тогда как в области поглощения пептидных хромофоров (190–250 нм) видны отчетливые, хотя и небольшие, различия (рис. 2а). Величина  $pK$ , рассчитанная из pH-зависимости эллиптичности полосы 227 нм, равна  $5,4 \pm 0,1$  (рис. 3). Поскольку, по данным ЯМР [6, 7, 9], единственной ионизирующей группой STX, которая титруется в интервале pH 4–7, является имидазольное кольцо His<sup>22</sup>, очевидно, что наблюдаемые изменения КД вызваны ионизацией этого остатка. В NT-I также имеется единственный остаток гистидина, расположенный в отличие от STX в С-концевом фрагменте молекулы (рис. 1). Изменений в КД-спектре NT-I в том же диапазоне pH не обнаруживает-

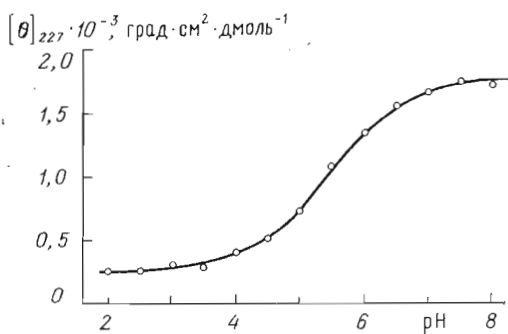


Рис. 3

Рис. 3. pH-Зависимость эллиптичности полосы 227 нм STX

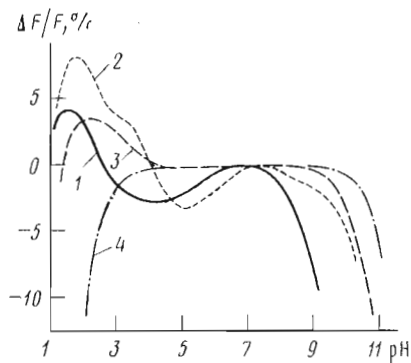


Рис. 4

Рис. 4. Кривые дифференциального флуоресцентного pH-титрования STX (1), [Lys<sup>27</sup>(Ac)]STX (2), NT-I (3) и Ac-Trp-NHMe (4).  $F$  и  $\Delta F$  – интенсивность флуоресценции при исходном значении pH и ее относительное изменение. Концентрация белков 0,1–0,2 мг/мл в 0,1 М NaCl, исходное pH 7,0–7,5, возбуждение и регистрация флуоресценции при 292 и 345 нм соответственно

ся (рис. 2б). Отсутствие изменений в спектре NT-I указывает на то, что в случае STX изменения в спектре не связаны с различием вкладов в КД нейтральной и ионной форм имидазольного кольца. Кроме того, постоянство амплитуды длинноволновой полосы ароматических хромофоров при pH-титровании позволяет предположить, что влияние pH на вид спектра в области 250–190 нм не вызывается изменением вклада боковых цепей Trp<sup>25</sup> или Trp<sup>29</sup> в наблюдаемый суммарный спектр. По-видимому, в STX в области pH 4–7,5 происходит конформационный переход. При этом относительное содержание регулярных и неупорядоченной форм во вторичной структуре STX, рассчитанное из КД-спектров по методу [10, 11], изменяется незначительно (в пределах 7%). Вклад антипараллельной  $\beta$ -структуры составляет  $26 \pm 3\%$ , что хорошо согласуется с данными рентгеноструктурного анализа.

*Флуоресценция триптофановых остатков в STX, его моноацетильном производном и NT-I.* Полосы флуоресценции обоих нейротоксинов при возбуждении светом с длиной волны  $\lambda_{\text{возб}}$  297 нм имеют максимум и полуширину (табл. 1), характерные для триптофановых остатков, расположенных на поверхности белковой глобулы [12]. Максимум излучения моноацетильного производного [Lys<sup>27</sup>(Ac)]STX сдвинут на 5 нм в коротковолновую область, а квантовый выход понижен на 30% по сравнению с природным STX. Спектр КД моноацетильного производного в области пептидных хромофоров не отличается от спектра нативного токсина, т. е. ацетилирование не влияет на вторичную структуру STX и наблюдаемые изменения флуоресценции не связаны с нарушением конформации токсина.

В производном STX, в котором по  $\epsilon$ -аминогруппе Lys<sup>27</sup> присоединена спиновая метка, квантовый выход в 8 раз меньше по сравнению с STX

Таблица 1

Параметры флуоресценции триптофановых остатков в STX, его производных и NT-I

| Образец                     | Максимум полосы излучения, нм | Полуширина, нм | Квантовый выход, % | Среднее время жизни, нс |
|-----------------------------|-------------------------------|----------------|--------------------|-------------------------|
| STX                         | 342±1                         | 57±1           | 6,5±0,6            | 2,1±0,1                 |
| [Lys <sup>27</sup> (Ac)]STX | 338±1                         | 55±1           | 4,7±0,5            |                         |
| [Lys <sup>27</sup> (SL)]STX | 340±2                         | 57±1           | 0,8±0,2            |                         |
| NT-I                        | 342±1                         | 57±1           | 6,3±0,6            | 1,5±0,1                 |

(табл. 1). Сильное тушение флуоресценции инвариантного  $\text{Trp}^{29}$  иминоксильным радикалом, присоединенным к  $\epsilon$ -аминогруппе остатка  $\text{Lys}^{27}$ , наблюдалось нами в моноспин-меченом нейротоксине короткого типа из яда *Naja naja oxiana* и было объяснено близостью боковых цепей  $\text{Lys}^{27}$  и  $\text{Trp}^{29}$  на расстоянии 0,4–0,6 нм [13]. Очевидно, боковая цепь  $\text{Lys}^{27}$  является одной из групп, формирующих микроокружение индольного флуорофора  $\text{Trp}^{29}$  и в STX.

*Влияние pH на флуоресценцию STX, его моноацетильного производного и NT-I.* Для STX, его моноацетильного производного и NT-I в щелочной области pH наблюдается снижение флуоресценции (рис. 4). Очевидно, что оно связано с титрованием ионогенных групп, так как из кривой pH-зависимости флуоресценции N-метиламида ацетил-L-триптофана следует, что гидроксил-ионы растворителя тушат флуоресценцию индольного флуорофора только при  $\text{pH} > 10$ . В диапазоне pH 7–10 в нейротоксинах титруются аминокруппы и фенольные кольца тирозиновых остатков. Известно, что аминокгруппа более эффективный тушитель в нейтральной форме, а боковая цепь тирозинового остатка – в ионной [14]. В STX фенольный гидроксил  $\text{Tyr}^{25}$  имеет  $\text{pK}$  11,3–11,4 [7] (по другим данным, выше 12 [5]). Поэтому наиболее вероятным кандидатом на pH-зависимое тушение флуоресценции  $\text{Trp}^{29}$  при pH 7,5 является  $\epsilon$ -аминогруппа  $\text{Lys}^{27}$ , имеющая  $\text{pK}$  9,7 [7]. Отнесение лизинового остатка опирается на изложенные выше результаты измерения спектров флуоресценции моноацетилированного и моноспин-меченого производных STX. Кроме того, в производном  $[\text{Lys}^{27}(\text{Ac})]\text{STX}$  тушение флуоресценции наблюдается при значениях pH, примерно на единицу больших, чем у самого STX, по-видимому, потому, что на кривой pH-титрования исчезает участок, отражающий тушащее действие  $\epsilon$ -аминогруппы  $\text{Lys}^{27}$  на флуоресценцию  $\text{Trp}^{29}$ .

Флуоресценция NT-I тушится при более высоких pH, чем STX, возможно, потому, что у NT-I  $\text{pK}$  остатка  $\text{Lys}^{27}$  выше. Следует отметить, что в NT-I по сравнению с STX имеются дополнительно два остатка тирозина (рис. 1). Один из трех тирозиновых остатков NT-I имеет  $\text{pK}$  10,7 [15]. Поэтому тушение флуоресценции NT-I в щелочной области может быть отчасти вызвано безызлучательным переносом энергии с триптофановых остатков на нонизованный тирозиновый остаток и эффектом внутреннего фильтра [16].

Величина  $\text{pK}$   $5,6 \pm 0,2$ , найденная по снижению квантового выхода STX в интервале pH 4–7,5 (рис. 4), характерна для имидазольной группы гистидинового остатка и в пределах ошибки совпадает с ранее найденным из pH-зависимости спектров КД значением. На модельных пептидах показано [17], что ионизованная форма имидазольного кольца является эффективным тушителем флуоресценции триптофановых остатков. Влияние ионного состояния боковой цепи гистидинового остатка на флуоресценцию инвариантного остатка  $\text{Trp}^{29}$  было обнаружено ранее и в коротких нейротоксинах [13, 18, 19].

В кристаллической форме STX укладка полипептидной цепи такова, что расстояние между боковыми группами остатков  $\text{His}^{22}$  и  $\text{Trp}^{29}$  составляет 2,0–2,5 нм [2]. Если исходить из того, что в растворе расстояние между ними такое же, то тушение индольного флуорофора за счет непосредственного контакта с имидазольным кольцом невозможно.

В случае NT-I, у которого, как отмечалось выше, титрование остатка  $\text{His}^{71}$  не сказывается на КД-спектре, не наблюдается также изменения флуоресценции в интервале pH 4–7,5.

При снижении pH примерно до 2 обнаруживается увеличение интенсивности флуоресценции, превосходящее тушащее действие протонов, которое проявляется на кривой титрования N-метиламида ацетил-L-триптофана (рис. 4). Рост интенсивности обусловлен титрованием карбоксильных групп и дает величины  $\text{pK}$   $2,6 \pm 0,2$  и  $3,4 \pm 0,1$  для STX и NT-I соответственно. Возрастание флуоресценции при титровании карбоксильных групп отмечалось ранее также и для коротких токсинов [13, 19], что свидетельствует о подобии микроокружения инвариантного триптофанового остатка в нейротоксинах короткого и длинного типов.

В модельных системах, содержащих индолный флуорофор и карбоксильную группу, переход в кислую область pH сопровождается снижением флуоресценции, поскольку нейтральная форма — более эффективный тушитель, чем карбоксилат-ион [14]. В нейротоксинах рост интенсивности флуоресценции при протонировании некоторой карбоксильной группы может сопровождаться увеличением расстояния между индолным кольцом и этой группой. В результате тушащий эффект карбоксильной группы будет нивелирован. Недавно показано [20], что перемещение карбоксильной группы относительно индольного кольца всего на 0,4 нм приводит к 10-кратному изменению квантового выхода. Кроме того, возможно опосредованное влияние карбоксильных групп на флуоресценцию триптофановых остатков через другие заряженные и полярные группы, окружающие индолные кольца. То, что такое взаимодействие зарядов существует, следует из сопоставления кривых pH-титрования природного STX и его моноацетильного производного.

Зависимость флуоресценции  $[Lys^{27}(Ac)]STX$  от pH (рис. 4) отражает титрование по меньшей мере двух карбоксильных групп с  $pK$  около 4 и 2,3. По-видимому, нейтрализация заряда на  $Lys^{27}$  при замене  $\epsilon$ -аммонийной группы на ацетамидную привела к увеличению  $pK$  близлежащей карбоксильной группы и титрование ее стало проявляться в виде отдельного, четко выраженного участка. Наконец, не исключено образование нефлуоресцирующего комплекса за счет водородной связи между индолным кольцом и карбоксилат-ионом. В этом случае протонирование карбоксильной группы будет приводить к разрушению водородной связи и, как следствие, к возрастанию флуоресценции. Ранее водородная связь между боковыми цепями остатков  $Trp^{29}$  и  $Asp^{31}$  в STX рассматривалась как возможная причина низкого значения  $pK$  карбоксильной группы  $Asp^{31}$  [5].

*Кинетика затухания флуоресценции триптофановых остатков.* Деактивация возбужденного состояния триптофановых остатков носит сложный, немонотонно-экспоненциальный характер как для NT-I, так и в случае STX, хотя последний имеет только один остаток триптофана. Микроокружение триптофановых остатков в STX и NT-I, согласно данным pH-титрования, гетерогенно. Оно включает положительно и отрицательно заряженные группы, обладающие различным тушащим действием. Кроме того, не исключен контакт индолных колец с атомами серы дисульфидного мостика  $Cys^{30}$ - $Cys^{34}$ , который может приводить к безызлучательной синглет-триплетной конверсии возбужденных индолных хромофоров [21]. Вероятно, одновременно реализуется несколько путей деактивации возбужденного состояния, которое протекает через различные промежуточные стадии с различными скоростями. В итоге закон затухания отклоняется от монотонно-экспоненциального [22].

Среднее время жизни флуоресценции ( $\bar{\tau}$ ), отнесенное к величине квантового выхода, равно 39 и 24 для STX и NT-I соответственно. Для растворов триптофана это соотношение около 15 [12]. Завышенные значения отношения среднего времени жизни к величине квантового выхода  $\bar{\tau}/q$  свидетельствуют о наличии статического тушения флуоресценции в NT-I и особенно STX. К статическому тушению может приводить, в частности, образование водородной связи индольного протона с карбоксилат-ионом.

*Тушение флуоресценции триптофанилов в STX и NT-I акриламидом и иодидом калия.* Для характеристики микроокружения флуорофоров и выяснения их расположения относительно поверхности белковой молекулы часто применяют метод экзогенного тушения флуоресценции [12]. Ранее Букалова-Орлова с соавт. [16] на основании данных по тушению флуоресценции NT-I ионами  $I^-$  и  $Cs^+$  пришли к заключению о преобладании положительно заряженных групп в окружении триптофановых остатков. Выше было показано, что для инвариантного остатка  $Trp^{29}$  одной из таких групп является боковая цепь остатка  $Lys^{27}$ . Тушение флуоресценции STX и его моноацетильного производного заряженным и нейтральным тушителем подтверждает этот вывод. График тушения флуоресценции  $[Lys^{27}(Ac)]STX$  иодидом калия, представленный в координатах Штерна-Фольмера (рис. 5), имеет значительно меньший наклон, чем подобный

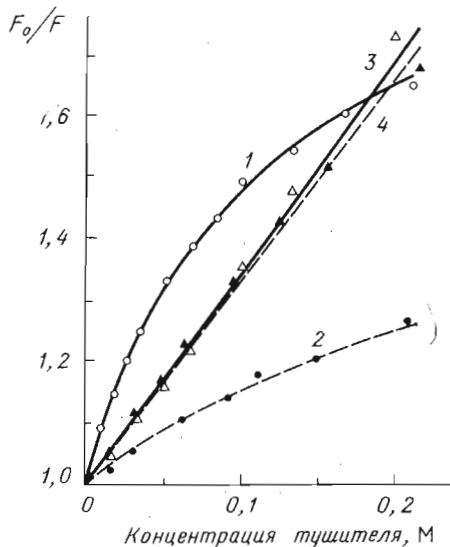


Рис. 5

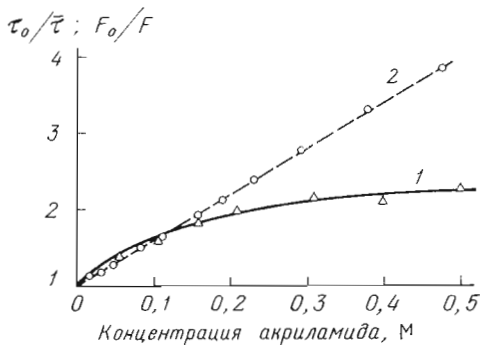


Рис. 6

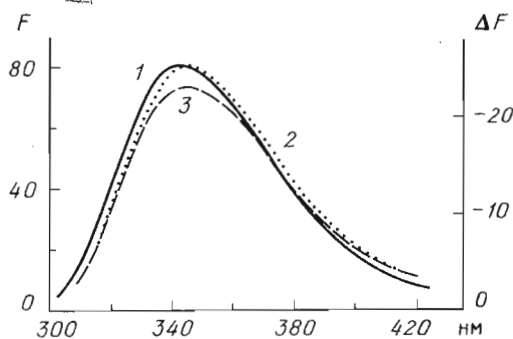


Рис. 7

Рис. 5. Графики в координатах Штерна-Фольмера тушения флуоресценции STX (1, 3) и  $[Lys^{27}(As)]$  STX (2, 4) подидом калия (1, 2) и акриламидом (3, 4).  $F_0$  и  $F$  — начальная интенсивность флуоресценции и после добавления тушителя. Концентрация белков 0,1 мг/мл, длина волны возбуждения 295 нм, эмиссии — 345 нм

Рис. 6. Штерн-вольмеровские зависимости среднего времени жизни флуоресценции (1) и интенсивности флуоресценции (2) для NT-I от концентрации акриламида.  $\tau_0$  — исходное значение времени жизни,  $\tau$  — время жизни в присутствии тушителя, остальные обозначения и условия как на рис. 5

Рис. 7. Корректированные спектры излучения триптофановых остатков в NT-I (1) и дифференциальные спектры флуоресценции ( $\Delta F$ ), возникающие при добавлении акриламида (2) и иодида (3). Концентрация NT-I — 0,1 мг/мл, акриламида — 0,06 М, KI — 0,18 М, длина волны возбуждения 295 нм

график для нативного токсина, т. е. ацетилирование приводит к снижению доступности индольного кольца иодид-иону. Причина снижения доступности кроется в ликвидации заряда боковой цепи остатка  $Lys^{27}$ , поскольку графики тушения STX и  $[Lys^{27}(As)]$ STX нейтральным тушителем, акриламидом, совпадают.

При тушении NT-I акриламидом вид штерн-вольмеровского-графика (рис. 6) зависит от того, что именно рассматривается как функция концентрации тушителя — время жизни флуоресценции или интенсивность. Уменьшение наклона штерн-вольмеровской зависимости среднего времени жизни флуоресценции от концентрации акриламида может быть обусловлено различием стерических факторов, ограничивающих доступность боковых цепей  $Trp^{29}$  и  $Trp^{33}$  молекулам тушителя, и неодинаковыми  $\tau$  этих остатков. Более быстрое снижение интенсивности флуоресценции ( $F$ ), чем  $\tau$ , при концентрации акриламида выше 0,2 М говорит о наличии помимо динамического статического механизма тушения [22]. Отметим, что график штерн-вольмеровской зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации акриламида выглядит прямолинейным и, если не проводить параллельно измерений времени жизни, может привести к неверному выводу об однородности окружения триптофановых остатков (в терминах доступности их молекулам акриламида).

Параметры флуоресценции Dns-метки и триптофановых остатков в Dns-производных NT-I

| Образец                       | Максимум полосы излучения, нм |     | Квантовый выход, % |     | Эффективность переноса энергии |                    |
|-------------------------------|-------------------------------|-----|--------------------|-----|--------------------------------|--------------------|
|                               | Trp                           | Dns | Trp                | Dns | тушение Trp                    | сенсibilизация Dns |
| [Lys <sup>39</sup> (Dns)]NT-I | 342                           | 555 | 3,9                | 13  | 0,63                           | 0,68               |
| [Lys <sup>60</sup> (Dns)]NT-I | 342                           | 540 | 4,3                | 17  | 0,62                           | 0,64               |
| Dns-Leu                       | —                             | 575 | —                  | 9,2 | —                              | —                  |

Дополнительную информацию о локальном окружении триптофановых остатков при исследовании методом тушения дает сопоставление дифференциальных спектров затушенных триптофановых остатков с первоначальным спектром флуоресценции белка. Разностный спектр затушенных акриламидом или иодидом остатков в NT-I сдвинут на 2 нм в красную область по сравнению с суммарным излучением нейротоксина в отсутствие тушителя (рис. 7). В случае STX и [Lys<sup>27</sup>(Ac)]STX дифференциальные спектры флуоресценции, возникающие по мере добавления тушителей, совпадают по положению максимума и полуширине с первоначальным спектром белка или его производного соответственно. Очевидно, в NT-I один из двух триптофановых остатков имеет более длинноволновую полосу эмиссии и, следовательно, находится в более полярном и быстро релаксирующем окружении. Поэтому этот остаток более доступен молекулам растворителя и низкомолекулярным растворенным веществам.

*Флуоресценция дансильрованных производных NT-I.* Параметры флуоресценции Dns-меток для [Lys<sup>39</sup>(Dns)]NT-I и [Lys<sup>60</sup>(Dns)]NT-I представлены в табл. 2. Максимум полосы флуоресценции метки на Lys<sup>39</sup> близок к тем величинам, которые наблюдались для других дансильрованных производных NT-II [6]. Излучение дансильной группы в [Lys<sup>60</sup>(Dns)]NT-I более коротковолновое, т. е. Dns-группа на Lys<sup>60</sup> находится в более гидрофобном окружении [23].

Флуоресценция триптофановых остатков в Dns-производных NT-I потушена на 60–70% по сравнению с нативным токсином (табл. 2). При этом сдвиги полос излучения триптофановых остатков по сравнению с нативным NT-I не обнаруживаются. КД-спектры дансильрованных производных NT-I незначительно отличаются от спектров нативного белка. Из этого следует, что введение меток не возмущает вторичную структуру нейротоксина и микроокружение остатков Trp.

В корректированных спектрах возбуждения флуоресценции Dns-меток имеется плечо 280 нм, отсутствующее в спектре возбуждения модельного соединения, Dns-Leu (рис. 8), что говорит о миграции энергии с триптофановых остатков на Dns-группу [24]. Эффективности переноса энергии, вычисленные по сенсibilизации флуоресценции меток и по снижению квантового выхода триптофановых остатков в дансильрованных производных по сравнению с нативным токсином (расчет см. в «Экспер. части»), практически совпадают. Следовательно, присоединение меток к  $\epsilon$ -аминогруппам Lys<sup>39</sup> и Lys<sup>60</sup> не приводит к таким изменениям структуры белка и окружения триптофановых остатков, которые сопровождалась бы появлением дополнительных механизмов их тушения помимо переноса энергии [24]. Этот вывод согласуется с обсуждавшимися выше результатами измерения спектров КД и флуоресценции триптофановых Dns-производных NT-I. Совпадение эффективностей переноса энергии, вычисленных по тушению флуоресценции триптофановых остатков и сенсibilизации меток, говорит также о том, что в процесс тушения флуоресценции не вовлечены мультиплетные и обменно-резонансные механизмы тушения, которые наблюдаются при расстояниях между индольным кольцом и дансильной группой  $\leq 1,0$  нм.



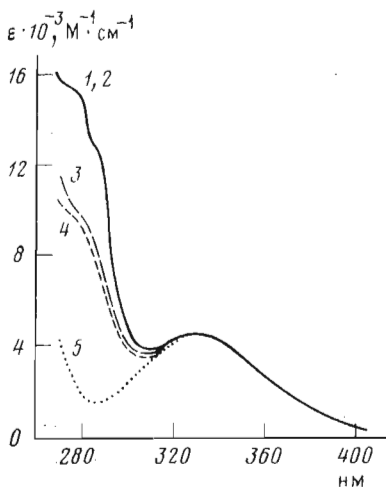


Рис. 8. Спектры поглощения (1, 2) и скорректированные спектры возбуждения (3–5) флуоресцентно-меченых производных [Lys<sup>39</sup>(Dns)]NT-I (1, 3), [Lys<sup>60</sup>(Dns)]NT-I (2, 4) и модельного соединения Dns-Leu (5). Излучение регистрировалось на 550 нм, полоса пропускания монохроматоров возбуждения и эмиссии составляла 2 и 10 нм

Иными словами, дансильные метки удалены от индолных колец любого из двух триптофанилов в NT-I не менее чем на 1,0 нм.

В результате проведенных исследований показано, что титрование остатка His<sup>22</sup> приводит к конформационному переходу, при этом вторичная структура STX меняется незначительно. Подобного рода конформационные изменения в диапазоне pH 4–7 являются, возможно, общей чертой длинных нейротоксинов, имеющих гистидиновый остаток в положении 22. Правомерность такого предположения подтверждается тем, что в NT-I, в котором такой остаток локализован в С-концевом фрагменте молекулы, изменений структуры в интервале pH 4–7 не обнаруживается.

Появление заряда на имидазольном кольце His<sup>22</sup> в STX отражается на микроокружении инвариантного для различных токсинов Trp<sup>29</sup>, хотя, по рентгеноструктурным данным, эти остатки располагаются на противоположных краях центральной петли, т. е. расстоянии 2–2,5 нм.

Этот результат не согласуется с выводами работы [6], в которой не удалось обнаружить влияние имидазольного кольца His<sup>22</sup> на Trp<sup>29</sup> в STX. Очевидно, метод флуоресценции в дифференциальном варианте более чувствителен к изменению окружения триптофанового остатка, чем методы КД и ПМР. Сопоставление токсинов длинного типа, NT-I и STX, важно в связи с тем, что в литературе высказывается мнение о меньшей конформационной лабильности длинных токсинов по сравнению с короткими и на этом основании объясняется различие в кинетике образования и диссоциации комплексов токсинов этих типов с ацетилхолиновым рецептором [5]. На наш взгляд, такая градация нейротоксинов недостаточно обоснована, поскольку известны примеры как более значительного влияния температуры [15, 25], pH и добавок органических растворителей [15] на конформацию токсинов именно длинного типа, так и заметного различия в конформационной лабильности токсинов, относящихся к одному типу [25, 26]. Полученные нами данные по pH-титрованию STX и NT-I также говорят о том, что конкретные особенности структуры (положение гистидинового остатка) могут оказывать влияние на конформацию токсинов одного типа, сопоставимое с тем, которое обусловлено различием в структуре коротких и длинных токсинов.

Полученные данные о конформации STX и NT-I в растворе в основном согласуются с картиной укладки полипептидной цепи STX в кристалле (несмотря на то что кристаллы получены в кислой среде в присутствии органического растворителя). Этот вывод имеет существенное значение при исследовании закономерностей связывания нейротоксинов длинного типа с ацетилхолиновым рецептором.

Авторы выражают благодарность И. А. Болотиной и В. Ю. Лугаускасу (ИМБ АН СССР) за помощь при расчетах вторичной структуры и Л. Б. Сенявиной (ИБХ им. М. М. Шемякина АН СССР) за помощь при съемке КД-спектров.

## Экспериментальная часть

Выделение STX и получение  $[\text{Lys}^{27}(\text{Ac})]\text{STX}$  были описаны ранее [27]. NT-I выделяли в основном как описано в работе [28] и после хроматографии на карбоксиметилцеллюлозе CM-32 подвергали дополнительной очистке на сефадексе G-50 (две колонки размером  $1 \times 100$  см) в  $0,01 \text{ M NH}_4\text{OAc}$ -буфере при pH 5,5.

$[\text{Lys}^{39}(\text{Dns})]\text{NT-I}$  и  $[\text{Lys}^{60}(\text{Dns})]\text{NT-I}$  получали реакцией NT-I с Dns-Cl, а  $[\text{Lys}^{27}(\text{SL})]\text{STX}$  — реакцией с N-оксисукцинимидным эфиром 2,2,6,6-тетраметил-4-карбоксиметилпиперидил-1-оксида (условия реакции, разделение производных и установление положения меток будут описаны отдельно).

Все оптические измерения проводили в  $0,01 \text{ M}$  фосфатном буфере (pH-титрование в  $0,1 \text{ M NaCl}$ ). Спектры поглощения снимали на спектрофотометре Beckman Acta M-VI (Австрия). Спектры КД получены на дихрографе Jobin-Yvon Mark III S (Франция) с накопителем Nicolet 1070 (США). Эллиптичность рассчитана на средний аминокислотный остаток с молекулярной массой 110. Измерения pH растворов осуществляли с помощью комбинированного полумикроэлектрода на pH-метре Beckman pH-asar (Австрия). Флуоресцентные измерения выполнены на корректирующем спектрофлуориметре Aminco SPF-1000 (США). Дифференциальное флуоресцентное pH-титрование проводили по методике, предложенной в работе [18]. Величины  $pK$  определяли как значения pH, которые соответствуют полуамплитуде изменения измеряемого физического параметра ( $[\theta]$  или  $F$ ). Зондирование зарядового окружения триптофановых остатков с привлечением дифференциальной методики измерения флуоресценции проводили следующим образом. В две кюветы помещали одинаковые растворы белков ( $1,5\text{--}2,0$  мл) и в одну из кювет вносили микрошприцем раствор тушителя  $3 \text{ M KI}$  или  $5,5 \text{ M}$  акриламид, а в другую — такой же объем  $3 \text{ M NaCl}$  или буфера. Квантовые выходы  $q$  определяли относительным методом [29], при этом за стандарты были приняты растворы триптофана в воде ( $q=0,20 \pm 0,01$  [30]) и хининсульфата в  $0,1 \text{ n. H}_2\text{SO}_4$  ( $q=0,55 \pm 0,05$  [31]).

Времена жизни флуоресценции измеряли на импульсном флуориметре PRA (Канада) в режиме однофотонного счета [32]. Разложение экспериментальных кривых затухания флуоресценции на сумму экспонент проводили по методу [33] согласно уравнению

$$I = I_0(\alpha_1 e^{-t/\tau_1} + \alpha_2 e^{-t/\tau_2}),$$

где  $I$  и  $I_0$  — интенсивность флуоресценции в момент времени  $t$  и ее максимальное значение;  $\alpha_1$  и  $\alpha_2$  — вклады соответствующих компонентов в суммарную интенсивность ( $\alpha_1 + \alpha_2 = 1$ );  $\tau_1$  и  $\tau_2$  — времена жизни возбужденного состояния. Величину  $\bar{\tau}$  находили как  $(\alpha_1 \tau_1 + \alpha_2 \tau_2)$ .

Эффективность резонансного диполь-дипольного переноса энергии ( $E$ ) рассчитывали по понижению квантового выхода флуоресценции донора:

$$E = 1 - q/q_0,$$

а также по сенсбилизации флуоресценции акцептора (для Dns-меченых аналогов NT-I):

$$E = \frac{F_A - \epsilon_A}{\epsilon_P - \epsilon_A},$$

где  $q_0$  и  $q$  — квантовые выходы флуоресценции триптофанолов в нативном токсине и соответствующем Dns-производном,  $\epsilon_P$  и  $\epsilon_A$  — спектры поглощения (в единицах молярных коэффициентов экстинкции) дансильированного белка и собственно дансильной метки (спектр модельного соединения Dns-Leu);  $F_A$  — скорректированный спектр возбуждения акцептора, нормированный по интенсивности со спектром поглощения при  $330 \text{ нм}$ . Для того чтобы исключить ошибку, вносимую переносом энергии с тирозиновых остатков, расчет  $E$  выполнен для интервала длин волн возбуждения  $290\text{--}300 \text{ нм}$ .

ЛИТЕРАТУРА

1. *Karlsson E.* In: Handbook of Experimental Pharmacology / Ed. Lee C. Y. Berlin: Springer Verlag, 1978, v. 52, p. 159-212.
2. *Walkinshaw W. D., Saenger W., Maelicke A.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, № 5, p. 2300-2404.
3. *Tsernoglou D., Petsko G.* FEBS Lett., 1976, v. 68, № 1, p. 1-4.
4. *Endo T., Inagaki K., Hayashi K., Miyazawa T.* Eur. J. Biochem. 1981, v. 120, № 1, p. 117-124.
5. *Inagaki F., Clayden N. G., Tamiya N., Williams R. J. P.* Eur. J. Biochem., 1981, v. 120, № 2, p. 313-322.
6. *Tsetlin V. I., Karlsson E., Utkin Yu. N., Pluzhnikov K. A., Arseniev A. S., Surin A. M., Kondakov V. V., Bystrov V. F., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A.* Toxicol., 1982, v. 120, № 1, p. 83-93.
7. *Hider R. C., Drake A. F., Inagaki F., Williams R. J. P., Endo T., Miyazawa T.* J. Mol. Biol., 1982, v. 158, № 2, p. 275-291.
8. *Набиев И. Р., Плужников К. А., Траханов С. Д., Ефремов Е. С., Цетлин В. И.* Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 6, с. 836-846.
9. *Inagaki F., Clayden N. G., Tamiya N., Williams R. J. P.* Eur. J. Biochem., 1982, v. 123, № 1, p. 99-104.
10. *Бологина И. А., Лугаускас В. Ю., Птицын О. Б.* Молекулярн. биология, 1981, т. 15, вып. 1, с. 167-175.
11. *Бологина И. А., Чехов В. О., Лугаускас В. Ю., Финкельштейн А. В., Птицын О. Б.* Молекулярн. биология, 1980, т. 14, вып. 4, с. 891-901.
12. *Бурштейн Э. А.* Собственная люминесценция белка. М.: Изд. ВИНТИ, 1976, сер. «Биофизика», т. 7.
13. *Сурин А. М., Уткин Ю. Н., Плужников К. А., Ефремов Е. С., Цетлин В. И.* Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 3, с. 342-356.
14. *Бурштейн Э. А.* Люминесценция белковых хромофоров. М.: Изд. ВИНТИ, 1976, сер. «Биофизика», т. 6.
15. *Tsetlin V. I., Mikhaleva I. I., Myagkova M. A., Senyavina L. B., Arseniev A. S., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A.* In: Peptides. Chemistry, Structure and Biology / Eds Walter R., Meienhofer J. Ann. Arbor: Ann Arbor Science, 1975, p. 935-941.
16. *Bukolova-Orlova T. G., Burstein E. A., Yukelson L. Yu.* Biochim. et biophys. acta, 1974, v. 342, № 2, p. 275-280.
17. *Shinitzky M., Goldman R.* Eur. J. Biochem., 1967, v. 3, № 2, p. 139-144.
18. *Арсеньева А. С., Сурин А. М., Уткин Ю. Н., Цетлин В. И., Быстров В. Ф., Иванов В. Т., Овчинников Ю. А.* Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 2, с. 197-207.
19. *Menez A., Montenay-Garestier Th., Fromageot P., Helene C.* Biochemistry, 1980, v. 19, № 23, p. 5202-5208.
20. *Royer J., Beugelmans-Verrier M., Beelman J.-F.* Photochem. Photobiol., 1981, v. 34, № 6, p. 667-671.
21. *Bukolova-Orlova T. G., Permyakov E. A., Burstein E. A., Yukelson L. Yu.* Biochim. et biophys. acta, 1976, v. 439, № 2, p. 426-431.
22. *Badea M. G., Brand L.* Methods in Enzymology, 1979, v. 61, p. 378-425.
23. *Chen R. F.* Arch. Biochem. and Biophys., 1967, v. 120, № 3, p. 609-620.
24. *Shiller P. W.* In: Biochemical Fluorescence: Concepts / Eds. Chen R. F., Edelhoch H. N. Y.: Marcel Dekker Inc., 1975, v. 1, p. 275-303.
25. *Drake A. F., Dufton M. J., Hider R. C.* Eur. J. Biochem., 1980, v. 105, № 3, p. 623-630.
26. *Nabedryk-Viala E., Thiery C., Menez A., Tamiya N., Thiery J. M.* Biochim. et biophys. acta, 1980, v. 626, № 2, p. 321-331.
27. *Karlsson E., Eaker D., Pontierius G.* Biochim. et biophys. acta, 1972, v. 257, № 2, p. 235-248.
28. *Туракулов Я. Х., Сорокин В. Т., Нишанходжоева С. А.* Биохимия, 1971, т. 36, № 6, с. 1282-1287.
29. *Parker C. A., Rees W. T.* Analyst, 1960, v. 85, № 3, p. 587-601.
30. *Teale F. W. J., Weber G.* Biochem. J., 1957, v. 65, № 6, p. 476-490.
31. *Melhuish W. H. J.* J. Phys. Chem., 1961, v. 65, № 2, p. 229-235.
32. *Cline Love L. J., Shaver L. A.* Analyt. Chem., 1976, v. 48, № 4, p. 364-371.
33. *Grinvald A., Steinberg I. Z.* Anal. Biochem., 1974, v. 59, № 2, p. 583-598.

Поступила в редакцию  
30.XII.1982

CIRCULAR DICHROISM AND FLUORESCENCE STUDIES ON THE LONG-CHAIN  
NEUROTOXINS FROM THE VENOM OF *NAJA NAJA SIAMENSIS* AND  
*NAJA NAJA OXIANA*

SUR.N A. M., PLUZHNIKOV K. A., UTKIN Yu. N., KARLSSON E.,  
TSETLIN V. I., SHAROV V. A.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow; Institute of Biophysics, Ministry of Health  
of the USSR, Moscow*

CD and fluorescence spectroscopy were used to study the conformational mobility of long-chain neurotoxins from the venom of cobra *Naja naja siamensis* and *Naja naja oxiana* (STX and NT-I, respectively). Microenvironment of tryptophan residues in these neurotoxins and their lysine-modified derivatives was also analyzed. Ionization of His<sup>22</sup> (pK 5,4—5,6) in STX influences the invariant Trp<sup>29</sup> microenvironment. No conformational change was observed on titration of single His residue situated in the C-terminal part of NT-I. Attachment of dansyl groups at Lys<sup>39</sup> or Lys<sup>60</sup> residues in NT-I is without effect on the native neurotoxin conformation. The distances from these labels to Trp<sup>29</sup> or Trp<sup>33</sup> indole rings are not shorter than 1,0 nm. The data obtained for STX and NT-I indicate that the STX X-ray structure may serve as a basis for studies on the solution conformation of the long-chain neurotoxins.