



УДК 547.962 + 547.993 : 543.422.23 + 543.426

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОРОТКИХ НЕЙРОТОКСИНОВ
ЗМЕИНОГО ЯДА МЕТОДАМИ ПРОТОННОГО
МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА И ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ *

Арсеньев А. С., Сурин А. М., Уткин Ю. П.,
Цетлин В. П., Быстров В. Ф., Иванов В. Т.,
Овчинников Ю. А.

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

α -Токсин южноафриканской кобры *Naja nigricollis* исследован методом ^1H -ЯМР при 300 МГц в H_2O и $^2\text{H}_2\text{O}$. Охарактеризовано микроокружение ряда функционально важных остатков: определены значения pK His^4 и His^{31} ; показано, что боковая цепь инвариантного Tyr^{28} имеет ограниченную доступность для растворителя и обложена с имидазольным кольцом His^{31} , а также с одной из карбоксильных групп; продемонстрирована ограниченная подвижность фенольного кольца инвариантного Tyr^{24} . На основании сопоставления этих результатов с полученными ранее данными ^1H -ЯМР-исследования нейротоксина II из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana*: а) проведено полное отнесение сигналов в ароматической части спектров обоих токсинов; б) показано, что микроокружение и подвижность боковых цепей обсуждавшихся выше остатков близки в двух нейротоксинах; в) при анализе спектральных характеристик и различий в первичной структуре исследованных нейротоксинов найдено, что обнаруженная ранее вблизи боковой цепи His^4 гуанидиновая группа одного из четырех имеющихся в молекуле нейротоксина II остатков аргинина может принадлежать Arg^{32} или Arg^{38} . Методом дифференциальной флуоресцентной спектроскопии у обоих токсинов обнаружено присутствие имидазольной, карбоксильной и аминогрупп в окружении остатков триптофана. Полученные данные о значительном сходстве микроокружения ароматических остатков свидетельствуют о подобии пространственной структуры двух исследованных нейротоксинов.

Среди разнообразных компонентов змеиного яда нейротоксины характеризуются наибольшей токсичностью и исключительно высокой специфичностью действия [3—6]. Наиболее хорошо изучены нейротоксины постсинаптического действия типа (60—62)-4, связывание которых с ацетилхолиновым рецептором блокирует проведение нервного импульса [3, 4, 7, 8]. Очевидно, что знание пространственной структуры нейротоксинов является важным условием для выяснения их механизма действия на молекулярном уровне. Недавно была установлена кристаллическая структура нейротоксинов яда морских змей *Laticauda semifasciata* [9, 10], в ряде лабораторий проводятся исследования спектральными методами конформации токсинов других змей в растворе ([11—17], ссылки на более ранние работы приведены в [2, 3]).

С помощью различных спектральных методов нами исследовались [1, 2] токсины яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana*: нейротоксины I и II, а также цитотоксины I и II, выделение и установление первичной

* Предыдущие работы этой серии см. [1, 2].

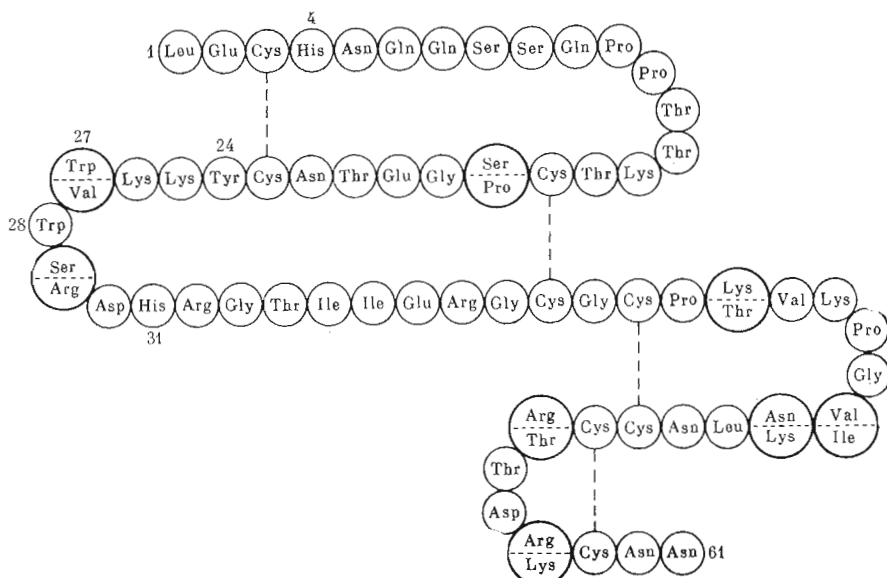


Рис. 1. Сравнение первичной структуры нейротоксина II *Naja naja oxiana* [19, 20] и α -токсина *Naja nigricollis* [22]. Выделенные участки указывают на различие в аминокислотной последовательности: сверху — нейротоксина II, внизу — α -токсина

структуры которых описаны в работах [18—21]. Наиболее детальная информация получена для «короткого» нейротоксина II (61 аминокислотный остаток) методом ЯМР высокого разрешения. Она включает в себя как характеристику конформационной стабильности всей молекулы в целом, так и сведения о микроокружении функционально важных ароматических остатков [2].

В настоящей работе методами ЯМР и флуоресцентной спектроскопии проведено сравнительное исследование нейротоксина II среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* и α -токсина южноафриканской кобры *Naja nigricollis* (первичная структура последнего приведена в работе [22]). Указанные токсины обладают высокой степенью гомологичности — они различаются всего восемью остатками (рис. 1). Кривые КД этих токсинов, снятые в различных средах [1, 11, 17], указывают на однотипность их пространственных структур. Используемые нами методы позволяли оценить, насколько коррелируют друг с другом данные о близости «макроструктур» токсинов с микроокружением отдельных остатков. Кроме того, при выборе объекта исследования мы учитывали, что в отличие от нейротоксина II в α -токсине имеется только один остаток триптофана, что давало возможность завершить отнесение сигналов ароматических остатков, начатое в предыдущей работе [2].

^1H -ЯМР-спектроскопия нейротоксина II и α -токсина. Рассмотрим данные спектроскопии ^1H -ЯМР для двух нейротоксинов. На рис. 2 представлена область спектра от 6,5 до 8,5 м. д., в которой расположены сигналы протонов боковых цепей ароматических остатков. Указанное на этом рисунке отнесение мультиплетных сигналов выполнено путем подавления спин-спинового взаимодействия с помощью тотального двойного резонанса, синглетные сигналы от гистидиновых остатков идентифицированы на основании характерных химических сдвигов, зависимости их положения от рН раствора, а также по данным дейтериеобмена. (Подробнее о методике отнесения сигналов в нейротоксине II см. [2].) Ниже проводится сравнение характеристик сигналов от ароматических протонов в нейротоксине II и α -токсине.

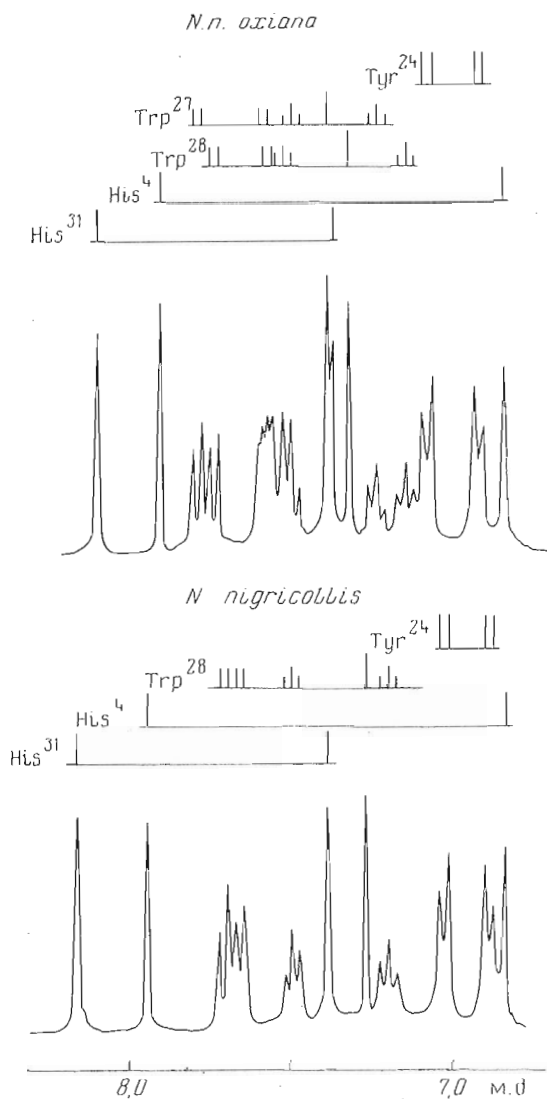


Рис. 2. Ароматическая область спектров ^1H -ЯМР (300 МГц) нейротоксина II и α -токсина в $^2\text{H}_2\text{O}$ (60° , pH 8,2)

Тирозиновые остатки. В обоих нейротоксинах сигналы от протонов СН фенольного кольца единственного тирозинового остатка, Tyr²⁴, обнаруживают практически одинаковое поведение. Выше 60° они представляют собой дублеты с расщеплением 8 Гц и близкими химическими сдвигами, не изменяющимися в области pH 1—9 (табл. 1, рис. 2, 3). При охлаждении происходит уширение сигналов фенольных СН, что свидетельствует о заторможенном вращении фенольного кольца. Причиной этого явления может быть стерически затрудненное анизотропное окружение тирозинового остатка в белковой глобуле, которое также может объяснить значительный сильнополюсный сдвиг рассматриваемых сигналов по сравнению с соответствующими сигналами в модельном трипептиде Cys-Tyr-Lys (табл. 1). В пользу стерической экранировки боковой цепи инвариантного тирозина гидрофобными остатками свидетельствуют данные КД и спектрофотометрического титрования нейротоксина II [1], а также результаты спектральных исследований и химической модификации род-

Химические сдвиги сигналов ароматических протонов и значения рК гистидинов в спектрах ¹H-ЯМР нейротоксина II и α-токсина при 32°

Соединение	Аминокислотный остаток	Наблюдаемый сигнал	Химический сдвиг, м.д.		рК	η	
			рН 2	рН 8			
Нейротоксин II	His ³¹	C ₂ H	9,01	8,08	5,93	1,02	
		C ₄ H	7,73	7,37	5,95	1,00	
	His ⁴	C ₂ H	9,26	7,91	5,02	0,95	
		C ₄ H	7,11	6,87	5,13	1,10	
	Trp ₆ ²⁸	NH *	10,70	10,70	—	—	
	Trp ₆ ²⁷	NH *	10,45	10,68 ***	3,2 **	—	
			10,68 ***	10,55	~6,0 **	—	
α-Токсин	Tyr ²⁴	C ₆ H, C ₆ H	7,03; 6,86	7,03; 6,86	—	—	
	His ³¹	C ₂ H	8,97	8,04	5,91	0,99	
		C ₄ H	7,67	7,32	5,98	1,00	
	His ⁴	C ₂ H	9,27	7,91	5,16	0,98	
		C ₄ H	7,07	6,82	5,3	1,2	
	Trp ²⁸	NH *		10,29	10,58 ***	3,2 **	—
				10,58 ***	10,52	~6 **	—
		C ₂ H		7,33	7,28 ***	~3,4 **	—
				7,28 ***	7,25	~6 **	—
		C ₄ H (C ₇ H)		7,72	7,70 ***	~3,4 **	—
				7,70 ***	7,68	~6	—
		C ₅ H (C ₆ H)		7,37	7,48	~3,4 **	—
				7,13	7,16	~3,4 **	—
	C ₇ H (C ₄ H)		7,64	7,62	~3,4 **	—	
Tyr ²⁴	C ₆ H, C ₆ H	7,00; 6,84	7,00; 6,84	—	—		
Tyr	C _{2,6} H, C _{3,5} H	7,46; 7,14	7,46; 7,14	—	—		

* Сигнал индольного протона NH, спектры сняты в растворе H₂O.

** Значение рК в точке перегиба зависимости химического сдвига от рН.

*** Химический сдвиг определен при рН 5,2. В скобках указан второй вариант отнесения спиновсвязанных сигналов.

ственных токсинов [3, 4]. Кроме того, необходимо учитывать, что в нейротоксине II и α-токсине ограничение подвижности фенольного кольца может быть вызвано участием его гидроксильной группы в водородных связях. Такое объяснение, а именно образование водородной связи с сильной протонакцепторной группировкой, было предложено на основании анализа полос (846 и 834 см⁻¹) инвариантного тирозина, наблюдавшихся в спектрах комбинационного рассеяния коротких токсинов *Laticauda semifasciata*, *Lapemis hardwiskii* и *Enhydrina schistosa* [14, 15].

Гистидиновые остатки. В аминокислотной последовательности обоих нейротоксинов эти остатки занимают одинаковое положение — His⁴ и His³¹. Отнесение сигналов от C₂H и C₄H имидазольных колец ранее проведено для нейротоксина II двумя независимыми методами (с помощью селективного фотоокисления His³¹ и использования различия в скоростях обмена протонов C₂H на дейтерий и тритий [2]). Поскольку химические сдвиги и рН-зависимости химических сдвигов этих сигналов в спектрах нейротоксина II и α-токсина практически совпадают (рис. 4), можно полагать, что отнесение сигналов от протонов C₂H и C₄H имидазольного кольца с рК 5,1 к His⁴, а с рК 5,9 к His³¹ в нейротоксине II должно быть справедливо и для α-токсина. Отсюда следует также, что соответствующие остатки гистидина имеют сходное микроокружение в белковых глобулах обоих нейротоксинов.

Из рассмотрения аминокислотных последовательностей (рис. 1) видно, что пять замен касаются остатков, боковые цепи которых заряжены в той области рН, в которой происходит титрование гистидинов. Близость заряженных группировок является одним из факторов, определяющих значение рК имидазольного кольца гистидинового остатка [23]. Значения рК гистидиновых остатков в обоих токсинах совпадают (табл. 1), следовательно,

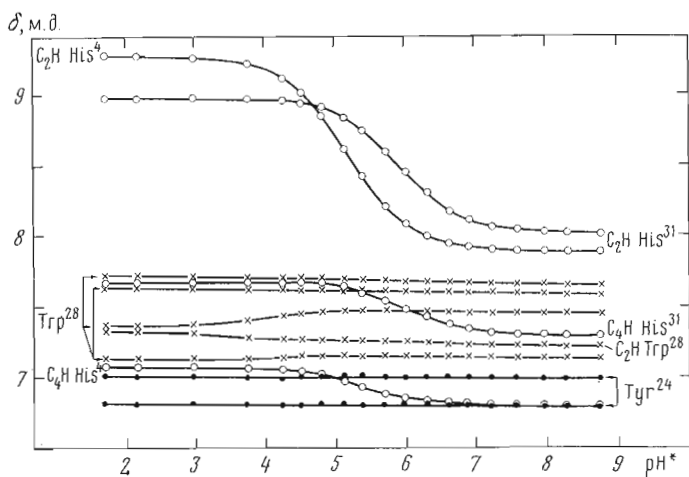


Рис. 3. Зависимость химических сдвигов сигналов протонов ароматических аминокислот α -токсина от pH раствора $^2\text{H}_2\text{O}$ (32°). Соединены сигналы от спинсвязанных протонов C_4H $\text{C}_5\text{H}-\text{C}_6\text{H}-\text{C}_7\text{H}$ Trp²⁸ и $\text{C}_{2,6}\text{H}-\text{C}_{3,5}\text{H}$ Trp²⁴

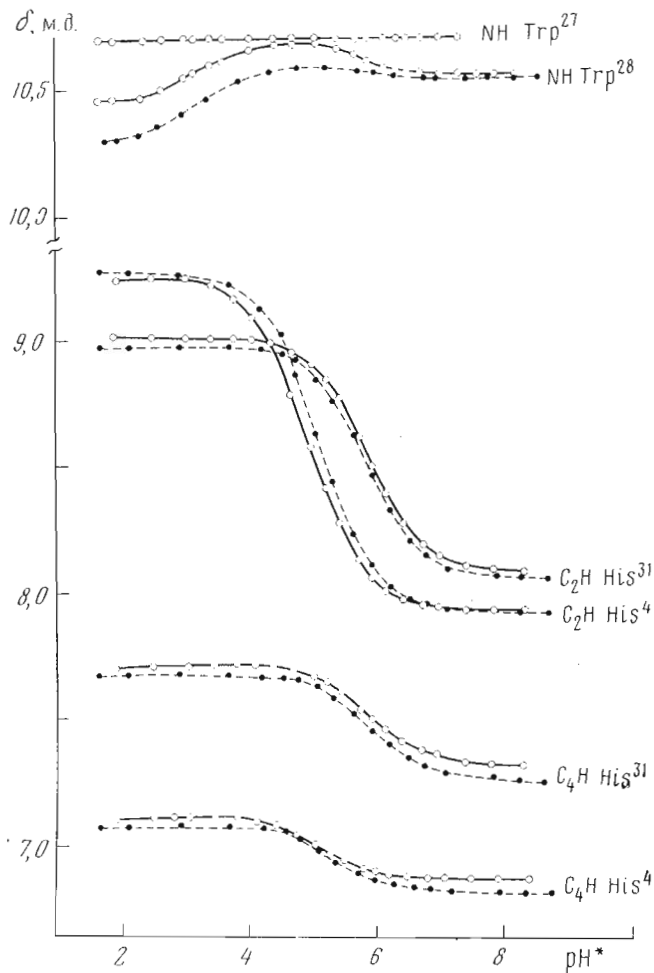


Рис. 4. pH-Зависимость химических сдвигов имидазольных протонов СН в $^2\text{H}_2\text{O}$ и амидных протонов NH в H_2O для нейротоксина II (сплошная линия) и α -токсина (пунктир) при 32°

но, заряженные боковые цепи остатков 29, 44, 50, 55 и 58, которые не являются общими для обоих токсинов, удалены от имидазольных колец His⁴ и His³¹. Оценка по [23] показывает, что соответствующее расстояние должно быть больше 10 Å.

С другой стороны, на основании определения скоростей дейтерообмена протонов C₂H и анализа рН-зависимости химических сдвигов сигналов C₂H и C₄H в нейротоксине II нами было показано [2], что в ближайшем окружении имидазольного кольца His⁴ находится положительно заряженная амино- или гуанидиновая группа. После ацилирования всех аминогрупп [2, 24] значение рК His⁴ практически не изменилось, что позволило сделать вывод о том, что его имидазольное кольцо может быть сближено только с одной из гуанидиновых групп. Влияние этой группировки приводит к низкому значению константы ионизации рК и высокой скорости дейтерообмена для His⁴ в нейротоксине II и может быть причиной низкого значения рК гомологичного остатка гистидина в α-токсине. Из сравнения первичных структур нейротоксинов (рис. 1) следует, что с имидазольным кольцом His⁴ может быть сближена гуанидиновая группа Arg³² или Arg³⁸, так как только эти остатки аргинина являются общими для обоих нейротоксинов.

Кроме перечисленных выше аналогий в спектральных параметрах сходный характер окружения гистидиновых остатков в двух исследованных токсинах проявляется и в том, что для них значения коэффициентов Хилла близки к 1, т. е. имидазольные кольца не испытывают электростатического влияния групп, титрующихся в области рН ≈ рК гистидинов, а также в том, что в обоих случаях вследствие быстрого протонного обмена с Н₂О не наблюдаются сигналы от имидазольных протонов NH.

Триптофановые остатки. В нейротоксине II имеется два остатка триптофана — Trp²⁷ и Trp²⁸, а в α-токсине — только один остаток Trp²⁸ (см. рис. 1). Сигналы триптофановых остатков нейротоксина II ведут себя различным образом [2]: химические сдвиги ароматических протонов одного из них (Trp_b) не зависят от рН, а сигнал его индольного NH (раствор в Н₂О) уширяется по мере увеличения рН и исчезает при рН 7,2. Химические сдвиги протонов индольной боковой цепи второго остатка (Trp_a) являются рН-зависимыми, в частности сигнал NH имеет две области изменения химического сдвига с точками перегиба при рН 3,2 и 6,0 (рис. 4), кроме того, этот сигнал отличается неизменностью полуширины (~ 7 Гц) до рН 8,2. Анализ ширины сигналов индольных протонов NH, зависящей от скорости протонного обмена с водой, привел к выводу о пониженной вероятности контактов индольного кольца Trp_a со средой по сравнению с Trp_b [2].

Ранее нам не удалось установить, какому положению в аминокислотной последовательности нейротоксина II (27 или 28) отвечают остатки Trp_a и Trp_b. Это сделано в настоящей работе путем сравнения спектров ¹H-ЯМР нейротоксина II и α-токсина. В α-токсине ароматические сигналы единственного остатка Trp²⁸ имеют две области изменения химических сдвигов (рис. 3 и 4) с точками перегиба при рН 3,2 и 6,0, при этом полуширина (~ 7 Гц) сигнала индольного NH не изменяется вплоть до рН 8,1. Последнее обстоятельство является следствием замедленного обмена с растворителем и указывает на то, что боковая цепь этого триптофана — подобно Trp_a в нейротоксине II — экранирована от контактов со средой. Таким образом, по данным ЯМР, все характеристики Trp_a в нейротоксине II и Trp²⁸ в α-токсине оказываются аналогичными, что дает основания полагать, что в нейротоксине II остаток Trp_a отвечает инвариантному Trp²⁸, а Trp_b — Trp²⁷. Эта идентификация завершает отнесения в ароматической области спектра ¹H-ЯМР нейротоксина II и означает, что именно боковая цепь инвариантного остатка Trp²⁸ испытывает влияние имидазольного кольца His³¹ (рис. 4, точка перегиба при рН 6,0 отвечает рК His³¹) и одной из карбоксильных групп, имеющей рК ~ 3,2 (рис. 3 и 4, табл. 1).

Рис. 5. Прямые (сплошные линии) и дифференциальные (пунктир) спектры флуоресценции нейротоксина II (а) и α -токсина (б). Справа на оси ординат интенсивность флуоресценции (F) в прямых спектрах, слева — изменения интенсивности флуоресценции (ΔF) для дифференциальных спектров. Концентрация белков 0,1–0,2 мг/мл в 0,1 М NaCl (32°). Длина волны возбуждения 292–295 нм, спектральная ширина щелей монохроматоров возбуждения и эмиссии 5 нм. Для дифференциальных спектров опорное значение рН 4,40, значения рН образцов указаны на кривых

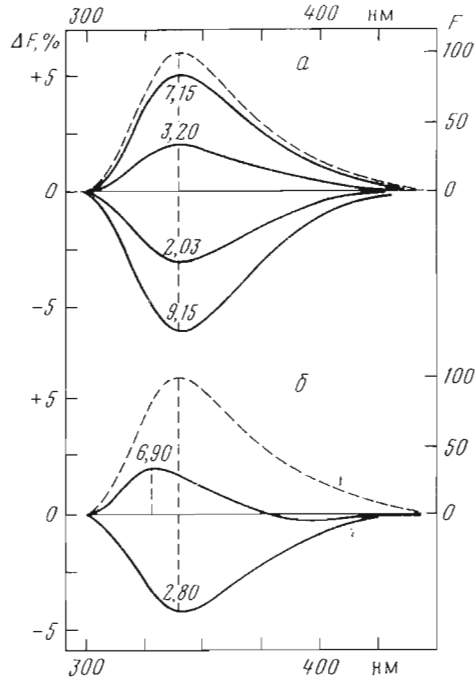
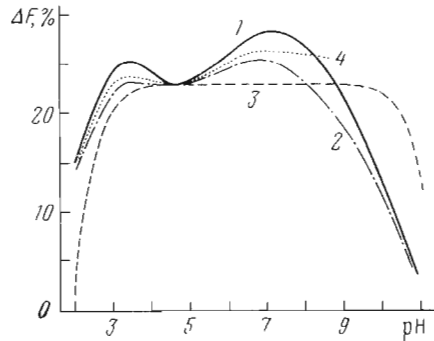


Рис. 6. Кривые дифференциального флуоресцентного титрования нейротоксина II (1), α -токсина (2), Ac-Trp-NHMe (3) и totally трифторацетилированного по аминогруппам нейротоксина II (4). Условия как на рис. 5, за исключением того, что спектральная ширина щелей возбуждения и эмиссии 1 и 40 нм соответственно для предотвращения «выгорания» образца в процессе титрования



рН-Зависимость флуоресценции нейротоксина II и α -токсина. Микроокружение остатков триптофана в двух нейротоксинах было также изучено методом флуоресценции. Как видно из рис. 5, в прямом и разностных спектрах флуоресценции нейротоксина II полуширина и положение максимума остаются практически неизменными, что свидетельствует о стабильности окружения триптофанов в исследованном диапазоне рН.

Ранее [25] был проведен анализ спектров флуоресценции нейротоксина II и отмечен их монокомпонентный характер, который авторы объяснили эффективным резонансным обменом энергией между двумя триптофанами, расположенными на поверхности белковой глобулы. Однако обсуждавшиеся выше данные ЯМР свидетельствуют об ограниченной доступности боковой цепи (точнее, индольного протона NH) Trp²⁸ растворителю. Аналогичный вывод об экранировании Trp²⁸ был получен при изучении образования комплексов с переносом заряда между положительно заряженными ароматическими катионами и ароматическими остатками нейротоксина *Naja philippinensis* [13], близкого по первичной структуре нейротоксину II и содержащего последовательность Trp²⁷—Trp²⁸ [12].

Параметры флуоресценции нейротоксинов

Соединение	Максимум эмиссии $\lambda_{\text{макс}}$, нм	Полуширина полосы $\Delta\lambda_{1/2}$, нм	Квантовый выход, φ
Нейротоксин II	340±1	58±1	0,16±0,02
α -Токсин	338±1	57±1	0,12±0,02
Гексатрифторацетилнейротоксин II	342±1	56±1	0,07±0,01

Спектры флуоресценции α -токсина при нейтральных значениях pH очень сходны со спектрами нейротоксина II (рис. 5 и табл. 2). Однако в разностных спектрах имеется сдвиг положения максимума и изменение формы полосы флуоресценции, что говорит о более высокой лабильности микроокружения триптофана в α -токсине. Несмотря на то что в α -токсине, как и в большинстве нейротоксинов короткого типа, инвариантный Trp²⁸ — единственный остаток триптофана в молекуле, оценка вероятности его контактов со средой не является вполне однозначной. В зависимости от используемого спектрального метода результаты зачастую оказываются противоречивыми. Например, упоминавшееся исследование [13] привело к выводу об экранировании Trp²⁸ в α -токсине *Naja nigricollis*; авторы же работ [11, 17] на основании данных по пертурбации трифторэтанолом УФ-спектров и спектров флуоресценции этого же токсина и эрабутоксина *b Laticauda semifasciata* отмечают лишь слабые ограничения в доступности триптофана, которые, однако, не проявляются, если в качестве пертурбантов использовать метанол или этиленгликоль. Отсутствие пика 1361 см⁻¹ в спектрах комбинационного рассеяния ряда коротких и длинных нейротоксинов [14—16] интерпретировалось как свидетельство экспонированности боковой цепи триптофана.

В целом имеющиеся данные позволяют охарактеризовать состояние боковой цепи инвариантного триптофана как «частично доступное». Доступность может несколько изменяться в зависимости от конкретного токсина и соседних гидрофобных или заряженных группировок. В частности, в нейротоксине II и α -токсине причиной обнаруживаемого методом ЯМР замедленного протонного обмена индольной группы NH Trp²⁸ с водой (ионом OH⁻) может быть не включение всей боковой цепи в белковую глобулу, а влияние соседней COO⁻-группы, имеющей $pK \sim 3,2$ на группу NH (возможно, с образованием водородной связи). Частично доступное положение боковой цепи Trp²⁸ и, следовательно, меньшая дискриминация по экспонированности Trp²⁸ и Trp²⁷ в нейротоксине II лучше согласуются с данными флуоресценции.

Дополнительная информация об окружении остатков триптофана была получена в данном исследовании с помощью флуоресцентного титрования в его наиболее чувствительном, дифференциальном варианте (рис. 6). Изменения интенсивности флуоресценции, наблюдаемые для обоих токсинов при pH 3—4 и отсутствующие у модельного соединения Ac-Trp-NHMe, очевидно, связаны с титрованием карбоксильных групп. В диапазоне значений pH 4,5—7,0 кривые титрования нейротоксина II и α -токсина имеют точку перегиба при pH $\sim 5,7$, которая, согласно данным ЯМР, может быть обусловлена титрованием имидазольного кольца His³¹. (Влияние ионизации остатков гистидина на квантовый выход флуоресценции сближенных с ними остатков триптофана ранее наблюдалось для пептидов и белков [26—30].) При pH $> 7,5$ для α -токсина отмечается снижение интенсивности флуоресценции, которое отсутствует у Ac-Trp-NHMe и, очевидно, обусловлено титрованием одной или нескольких аминогрупп, находящихся вблизи боковой цепи Trp²⁸. Уменьшение интенсивности флуоресценции в этой области pH, наблюдающееся и у нейротокси-

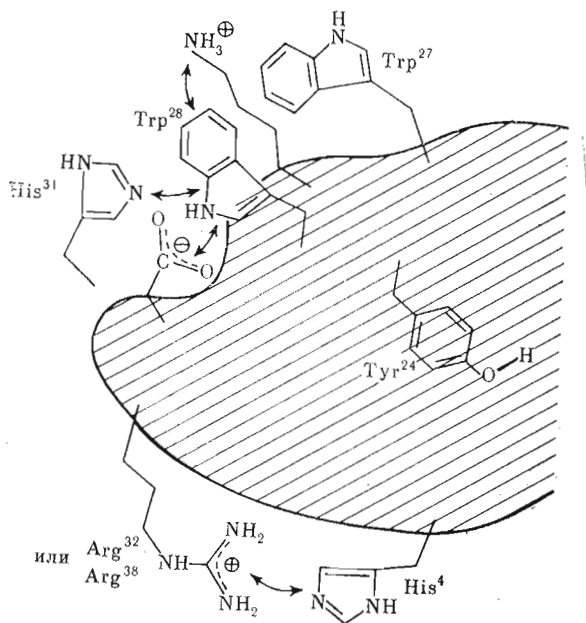


Рис. 7. Схема расположения ароматических аминокислотных остатков в белковой глобуле нейротоксина II по данным ^1H -ЯМР и флуоресценции

на II, вызвано влиянием аминогрупп на флуоресценцию Trp^{28} или же обоих триптофановых остатков. Тот факт, что за тушение флуоресценции в области pH 7,5—9,0 ответственно изменение ионного состояния соседних аминогрупп, подтверждается отсутствием изменений флуоресценции в этой области у аналога нейротоксина II, в котором все аминогруппы подвергнуты трифторацетилированию.

Таким образом, методы ЯМР и флуоресценции удачно дополняют друг друга: с помощью обоих обнаруживаются имидазольная и карбоксильная группы, сближенные с боковыми цепями триптофанов. Метод ЯМР позволил охарактеризовать каждый остаток триптофана в отдельности, чего не удалось сделать с помощью флуоресценции. В свою очередь, посредством флуоресцентных измерений оказалось возможным исследовать свойства триптофанов при значениях pH ≥ 10 и обнаружить сближенность Trp^{27} и/или Trp^{28} с одной или несколькими аминогруппами, идентификация которых может дать «контакты», необходимые для выяснения конформации молекулы.

На рис. 7 представлена схема, предлагавшаяся нами ранее [2] на основании исследования нейротоксина II методом ЯМР, в которую внесены изменения и дополнения по результатам данной работы: из четырех имеющихся в молекуле остатков аргинина рядом с боковой цепью His^4 может находиться гуанидиновая группа Arg^{32} или Arg^{38} ; указаны соседние остатки с Trp^{28} , боковая цепь инвариантного Trp^{28} изображена в «частично доступном» виде (в отличие от полностью экранированного, как было ранее), рядом с индольными кольцами изображена аминогруппа. В целом представленные на схеме данные находятся в хорошем соответствии с предварительными результатами рентгеноструктурного анализа нейротоксинов морских змей [9, 10].

В заключение необходимо отметить, что проведенное исследование выявило значительное сходство в микроокружении остатков His^4 , His^{31} , Tyr^{24} и Trp^{28} в двух нейротоксинах. В свете отмечавшегося выше подобия их «макроструктур» это говорит об общем типе пространственной структуры, на которую не влияют замены в восьми положениях аминокислотной по-

следовательности. На основании сравнения с имеющимися в литературе физико-химическими данными для других токсинов, в том числе и отличающихся от нейротоксина II большим числом замен (например, 23 в эрабутоксине *b* [17]), можно предположить, что «короткие» нейротоксины из яда змей в целом имеют похожую конформацию молекулы, стабильность которой и локальное окружение отдельных остатков могут, однако, различаться у разных токсинов. Это позволяет, с одной стороны, сравнивать данные, полученные для разных токсинов различными методами, а с другой — путем детальных исследований отдельных нейротоксинов выявлять закономерности пространственного строения, присущие всему семейству в целом.

Экспериментальная часть

α -Токсин из яда южноафриканской кобры был любезно предоставлен проф. П. Боке (Париж). Выделение нейротоксина II из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* описано в предыдущем сообщении [2].

Спектры ЯМР сняты в ампулах с внешним диаметром 5 мм в режиме непрерывного или импульсного облучения на спектрометре SC-300 Varian (США), снабженном ЭВМ типа 620/L-100 Varian (16 К). Химические сдвиги приведены относительно внешнего стандарта гексаметилди-силоксана. Концентрация нейротоксинов в растворах H_2O или 2H_2O составляла $6 \cdot 10^{-3}$ М. Приведенные значения рН отвечают прямому показанию рН-метра. Более детально условия эксперимента описаны в работе [2]. Зависимость химических сдвигов C_2-H и C_4-H протонов гистидиновых остатков от рН была согласована методом наименьших квадратов со следующим уравнением [31]:

$$(\delta_{H^+} - \delta_{набл}) / (\delta_{H^+} - \delta_{H^0}) = K_a^n / (K_a^n - [^2H_3O^+]^n),$$

где δ_{H^+} и δ_{H^0} — химические сдвиги сигналов имидазольного кольца в протонированной и нейтральной формах соответственно; $\delta_{набл}$ — наблюдаемый химический сдвиг, когда эти формы находятся в равновесии; K_a — константа диссоциации гистидина; n — коэффициент Хилла; $[^2H_3O^+]$ — концентрация ионов гидроксония в растворе, определяемая из показаний рН-метра.

Спектры флуоресценции сняты на спектрометре Aminco SPF-1000 (США). Квантовые выходы определялись как описано в работе [32]. В качестве стандарта был использован нейтральный водный раствор триптофана, квантовый выход которого равен 0,20 [33]. Для дифференциального флуоресцентного титрования исходный раствор белка помещали в две кюветы, снабженные мешалками и электродами для измерения рН. С помощью двух шприцев в одну из кювет вводили раствор 0,1—1 н. HCl или NaOH, а в другую — равный объем 0,1 М раствора NaCl. Кривые дифференциального флуоресцентного титрования записывались на двухкоординатном самописце, по одной оси которого регистрировался сигнал, подаваемый с внешнего выхода флуориметра, а по другой — с внешнего выхода рН-метра.

Авторы выражают благодарность проф. П. Боке за предоставленный образец α -токсина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tsetlin V. I., Mikhaleva I. I., Myagkova M. A., Arseniev A. S., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. (1975) in Peptides: Chemistry, Structure and Biology (Walter R., Meinhofer J., eds.), pp. 935—941, Ann Arbor Science.
2. Arseniev A. S., Balashova T. A., Utkin Yu. N., Tsetlin V. I., Bystrov V. F., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. (1976) Eur. J. Biochem., 71, 595—606.
3. Yang C. C. (1974) Toxicon, 12, 1—43.
4. Tu A. T. (1973) Ann. Rev. Biochem., 42, 235—258.
5. Condrea E. (1974) Experientia, 30, 121—129.
6. Lysz T. W., Rosenberg P. (1974) Toxicon, 12, 253—265.
7. Rang H. P. (1974) Quart. Rev. Biophys., 7, 283—399.

8. De Robertis E. (1975) Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 73, 9—38.
9. Tsernoglou D., Petsko G. A. (1976) FEBS Lett., 68, 1—4.
10. Low B. W., Preston H. S., Sato A., Rosen L. S., Searl J. E., Rudko A. D. Richardson J. S. (1976) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 2991—2994.
11. Menez A., Bouet F., Fromageot P., Tamiya N. (1976) Bull. Inst. Pasteur, 74, 57—64.
12. Hauert J., Maire M., Sussmann A., Bargetzi J. P. (1974) Int. J. Peptide Prot. Res., 6, 201—222.
13. Bargetzi J. P. (1976) C. r. Acad. sci., Ser. D, 283, 683—686.
14. Yu N. Y., Lin T. S., Tu A. T. (1975) J. Biol. Chem., 250, 1782—1785.
15. Harada I., Takamatsu T., Shimanouchi T., Miyazawa T., Tamiya N. (1976) J. Phys. Chem., 80, 1153—1156.
16. Takamatsu T., Harada I., Shimanouchi T., Ohta M., Hayashi K. (1976) FEBS Lett., 72, 291—294.
17. Menez A., Bouet F., Tamiya N., Fromageot P. (1976) Biochim. et biophys. acta, 453, 121—132.
18. Grishin E. V., Sukhikh A. P., Slobodyan L. N., Ovchinnikov Yu. A., Sorokin V. M. (1974) FEBS Lett., 45, 118—121.
19. Grishin E. V., Sukhikh A. P., Lukyanchuk N. N., Lipkin V. M., Ovchinnikov Yu. A., Sorokin V. M. (1973) FEBS Lett., 36, 77—78.
20. Arnberg H., Eaker D., Fryklund L., Karlsson E. (1974) Biochim. et biophys. acta, 359, 222—232.
21. Гришин Е. В., Сухих А. П., Адамович Т. Б., Овчинников Ю. А. (1976) Биоорг. химия, 2, 1018—1034.
22. Eaker D. L., Porath I. (1967) Jap. J. Microbiol., 11, 353—355.
23. Tanford C., Roxby R. (1972) Biochemistry, 11, 2192—2198.
24. Tsetlin V. I., Surin A. M., Utkin Yu. N., Arseniev A. S., Ivanov V. T. (1976) USSR — FRG Symposium on peptide and protein chemistry, Abstracts, p. 92, Dushanbe.
25. Bucolova-Orlova T. G., Permyakov E. A., Burstein E. A., Yukelson L. Ya. (1976) Biochim. et biophys. acta, 439, 426—431.
26. Shinitzky M., Katchalsky E., Grisaro V., Sharon N. (1966) Arch. Biochem. and Biophys., 116, 332—343.
27. Shinitzky M., Goldman R. (1967) Eur. J. Biochem., 3, 139—144.
28. Shinitzky M., Fridkin M. (1969) Eur. J. Biochem., 9, 176—181.
29. Shinitzky M., Fridkin M. (1969) Biochim. et biophys. acta, 434, 137—143.
30. Bushueva T. L., Busel E. P., Bushuev V. N., Burstein E. A. (1974) Stud. Biophys., 44, 129—139.
31. Markley J. L. (1975) Acc. Chem. Res., 8, 70—80.
32. Parker C. A., Rees W. T. (1960) Analyst, 85, 587—601.
33. Teale F. W. J., Weber G. (1957) Biochem. J., 65, 476—482.

Поступила в редакцию
27.VI.1977

COMPARATIVE PROTON MAGNETIC RESONANCE AND FLUORESCENCE STUDIES ON SHORT SNAKE VENOM NEUROTOXINS

ARSENIEV A. S., SURIN A. M., UTKIN Yu. N., TSETLIN V. I.,
BYSTROV V. F., IVANOV V. T., OVCHINNIKOV Yu. A.

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

α -Toxin from the venom of South Africa cobra *Naja nigricolis* has been studied by 300 MHz $^1\text{H-NMR}$ in H_2O and $^2\text{H}_2\text{O}^+$ solutions. Analysis of the chemical shift and line-width dependences on pH and temperature allowed to characterize the microenvironment of a number of functionally important residues: a) the pK values of His⁴ and His³¹ were determined; b) the side-chain of invariant Trp²⁸ was found to have a limited accessibility for solvent and to be in proximity to imidazole ring of His³¹ and a carboxyl group; c) a restricted mobility of the phenole ring of invariant Tyr²⁴ was demonstrated. From the present results and those obtained previously by $^1\text{H-NMR}$ studies of neurotoxin II from Middle-Asian cobra *Naja naja oxiانا*, a complete signal assignment in the aromatic region of spectra was attained for both toxins. These also share such common features as similar microenvironment and side-chain mobility of the above mentioned residues. A comparison of spectral data with the variations in the primary structure of the two neurotoxins reveals that a guanidine group, which was found earlier nearby His⁴ and might belong to any of the fo ginines of neurotoxin II, is that of Arg³² or Arg³⁸. Using difference fluorescence spectroscopy, imidazole, carb x and amino groups were found in tryptophan microenvironment for both toxins. The present findings on considerable similarity of aromatic residue microenvironment imply a common spatial structure for the two neurotoxins.