



УДК 577.322.6:548.737

© 1991 г.

А. М. Михайлов, А. В. Никитенко, Е. В. Четверина *,
С. Д. Траханов, В. К. Вайнштейн

ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ ОСНОВНОЙ ЦЕПИ МОЛЕКУЛЫ НЕЙРОТОКСИНА I ИЗ ЯДА КОБРЫ *NAJA NAJA OXIANA* И ЕЕ УКЛАДКА В КРИСТАЛЛИЧЕСКОЙ ЯЧЕЙКЕ

Институт кристаллографии АН СССР, Москва;
*Институт белка АН СССР, Пушкино Московской обл.

Методом молекулярного замещения определена структура C^{α} -цепи молекулы нейротоксина I (NTX-I) при разрешении 2,7 Å. NTX-I является одним из компонентов яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana*. NTX-I блокирует нервно-мышечный сигнал, специфически связываясь с рецептором ацетилхолина. Кристаллы токсина выращивали методом диффузии в парах и диализом через мембрану, используя специально приготовленные кристаллизационные ячейки. Набор дифрагированных кристаллом нативного белка рентгеновских интенсивностей, соответствующих области фурье-спектра 38—2,1 Å, собран ω -методом в автоматическом режиме на четырехкружном дифрактометре Syntex P2₁. Расчеты по определению ориентации и упаковки молекулы NTX-I в элементарной ячейке проведены на ЭВМ NORD-500 по программам комплексов MERLOT и BLANC.

Нейротоксин I (NTX-I) — один из компонентов яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana*. NTX-I блокирует нервно-мышечную передачу, специфически связываясь с рецептором ацетилхолина. Интерес к изучению структуры белков этого семейства объясняется тем, что нейротоксины являются высокоселективными инструментами изучения механизмов нервной проводимости, биосинтеза белка и гормональной регуляции. NTX-I по длине полипептидной цепи и числу дисульфидных связей можно отнести к классу «длинных» токсинов [1]. К настоящему времени известны результаты рентгеноструктурного исследования (при разрешении 2,8 Å [2]) лишь для одного нейротоксина, относящегося к этому классу, — α -кобротоксина (CTX).

Решение фазовой проблемы при расшифровке строения биомолекул, как правило, проводится посредством метода изоморфного замещения. Однако применение этого метода, особенно к малым белковым молекулам, встречает ряд принципиальных трудностей. В связи с этим определение структуры нейротоксина I было проведено с использованием альтернативного метода — метода молекулярного замещения, который в последние годы приобретает широкое распространение в рентгеноструктурном анализе белков.

Для определения структуры белка методом молекулярного замещения необходимо найти ориентацию и положение в ячейке заданной модели молекулы гомологичного белка.

При расчетах использовали атомную модель CTX из Protein Data Bank [3]. Полипептидная цепь NTX-I содержит 73 аминокислотных остатка, из них 63% одинаковы с CTX. Обе структуры имеют по пять дисульфидных связей [1]. По сравнению с CTX цепь NTX-I длиннее на два остатка (рис 1).

Модель CTX для удобства расчетов была предварительно повернута на углы Эйлера $\alpha = 0^{\circ}$, $\beta = 125^{\circ}$, $\gamma = 90^{\circ}$. Ориентация модели CTX определялась по программам, основанным на алгоритмах Кроутера [4] и Латмана [5], реализованным в комплексе программ MERLOT [6]. Анализ функции вращения в зависимости от величины радиуса интегрирования

```

NTX 1  ITCYKTPIPITSETCAPGQNLGYTKTWCOAWCGRSGKVIELGCAATCPTV
CTX 1  IRCFITPD-ITSKDCPNGH-VCYTKTWCFACFSIRGKRVLDGCAATCPTV
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          |---|          |---|
          β-I           β-II

NTX 51  ESYQDIKCCSTDDCNPHPKQKRP
CTX 49  KTGVDIQCSTDDCNPFPTKRKP
          * * * * * * * * * *
          |---|
          β-III

```

Рис. 1. Сравнение аминокислотных последовательностей нейротоксина I (NTX) и α -кобротоксина (CTX) [2]. β -I, β -II, β -III — бета-цепи

(от 12,5 до 23,9 Å) и используемой области рентгеновских интенсивностей (от 4,0 до 2,7 Å при $|F_0| > 3\sigma$) выявил пик, соответствующий повороту молекулы CTX на углы Эйлера $\alpha = 100^\circ$, $\beta = 78^\circ$, $\gamma = 111^\circ$. Величина этого пика в относительных единицах превышала остальные более чем в 1,3 раза.

Определение положения модели в элементарной ячейке NTX-I проведено по программам комплекса BLANC с использованием алгоритма модифицированной функции трансляции T3, а также по программам поиска минимального значения R -фактора (MERLOT). Расчеты велись с использованием экспериментальных данных с $|F_0| > \sigma$ и той же области фурье-спектра, что и в предыдущем случае. В результате расчетов были получены следующие координаты центра масс модели молекулы CTX: $x = 5,6$, $y = 32,0$, $z = 16,2$ Å.

В данной упаковке CTX значение R -фактора

$$R = \frac{\sum |F_0 - F_c|}{\sum |F_0|} \quad (1)$$

и коэффициента корреляции

$$C = \frac{\sum ((F_0 - \langle F_0 \rangle)(F_c - \langle F_c \rangle))}{\sqrt{(\sum (F_0 - \langle F_0 \rangle)^2) \sum (F_c - \langle F_c \rangle)^2}}, \quad (2)$$

где F_0 и F_c (экспериментальные и расчетные модули структурных амплитуд) составляли 54 и 37% соответственно (использовался набор $|F_0| > 3\sigma$ с разрешением 6,0—2,3 Å).

На первых этапах уточнения структуры использовалась непосредственно модель CTX, состоящая из 540 неводородных атомов (71 аминокислотный остаток). Первый 31 цикл уточнения вели по программе CORELS [7]. Она включает в себя минимизацию методом наименьших квадратов разницы между экспериментальными значениями модулей структурных амплитуд и их теоретическими значениями. При этом модель представляется в виде определенного набора жестких групп. Приемлемая стереохимия на участках между жесткими группами поддерживается за счет введения специальных геометрических ограничений. Таким образом, введением жестких и геометрических ограничений удается повысить отношение числа наблюдений к числу уточняемых параметров, что позволяет уточнять структуру при низком разрешении.

Для уменьшения систематических ошибок, полученных при расчете упаковки молекулы в кристаллической ячейке, были проведены 10 циклов уточнения модели как твердого тела с использованием гармоник фурье-спектра в области 12—8 Å⁻¹. Результатом этого явились поправки по углам Эйлера ($\Delta\alpha = 1,8^\circ$, $\Delta\beta = -2,2^\circ$, $\Delta\gamma = -3,3^\circ$) и координатам ($\Delta x = 0,33$, $\Delta y = 0,40$, $\Delta z = 0,49$ Å).

Затем модель была постепенно разбита на 10 доменов. Наряду с увеличением числа доменов увеличивалось и число отражений, используемых в уточнении. Такая процедура позволила снизить значение R -фактора с 0,578 при разрешении 12—8 Å до 0,422 при разрешении 6—4 Å (табл. 1).

После этого была проведена коррекция модели. Из модели CTX были удалены боковые группы 25 аминокислотных остатков, которые не соответствовали первичной последовательности NTX-I (см. рис. 1). 24 остатка были представлены в виде аланцинов и один — глицином, а вся модель содержала 452 атома (71 остаток).

Новый этап уточнения NTX-I проводился по методике, предусматриваемой программой Хендриксона и Конверта [8]. В отличие от програм-

Результаты уточнения исходной модели по программе CORELS

Число циклов уточнения	Число доменов	Область разрешения, Å	Число независимых отражений	Значение R^* -фактора	
				начальное	конечное
10	1	12,0–8,0	69	0,578	0,432
6	3	6,5–5,5	107	0,565	0,460
3	4	6,5–5,0	180	0,504	0,434
6	4	6,0–4,5	270	0,517	0,420
3	6	6,0–4,5	270	0,420	0,411
1	6	6,0–4,0	450	0,487	0,479
2	10	6,0–4,0	450	0,479	0,422

$$* R = \sum |F_o - F_c| / \sum |F_o|.$$

Таблица 2

Результаты уточнения по Хендриксона и Коннерту

Параметры	Без учета В *	С учетом В *
Область разрешения, Å	6,0–2,8	6,0–2,7
Число отражений	1630	1833
Число параметров	1358	1809
Число циклов	28	15
Конечный R -фактор	0,359	0,277
Конечный коэффициент корреляции	0,679	0,807
Среднеквадратичное отклонение для $C-N$ -связей	0,062	0,060
Среднеквадратичный сдвиг координат	0,997	0,235

* Индивидуальный температурный фактор.

мы CORELS в программе Хендриксона — Коннерта нет жестких ограничений на геометрию модели. В процессе уточнения здесь используется весовая схема, затрудняющая изменения в координатах атомов, при которых значения межатомных расстояний, валентных и двугранных углов аминокислотных остатков отличаются от их стандартных значений более чем на заранее заданную величину.

Процедура уточнения по программе CORELS привела к некоторым нарушениям геометрии атомной модели. Поэтому для восстановления стереохимии модели первые два цикла уточнения были проведены без учета рентгенодифракционных данных в режиме «идеализации».

Уточнение проводили по набору структурных амплитуд с $|F_o| > 2\sigma$. За 28 циклов уточнения в области разрешения 6–2,8 Å величина R -фактора снизилась до 0,359. Начиная с 29-го цикла уточнялись индивидуальные температурные факторы, а область разрешения была расширена до 2,7 Å. К 43-му циклу значение R -фактора снизилось до 0,277. Результаты уточнения представлены в табл. 2. Ход C^α -атомов цепи молекулы NTX-I и ее упаковка в элементарной ячейке, соответствующие этому этапу уточнения, приведены на рис. 2.

По модели, полученной в результате уточнения, были рассчитаны структурные факторы до разрешения 2,7 Å⁻¹, на основе которых построены карты электронной плотности с коэффициентами $(F_o - F_c) \exp(i\phi_c)$ и $(2F_o - F_c) \exp(i\phi_c)$. Анализ синтеза электронной плотности позволил выявить пик в области Ala¹⁸ и Ala¹⁹, соответствующий недостающему в модели остатку аспарагина. Так же были выявлены области электронной плотности, соответствующие некоторым недостающим боковым группам. В целом синтез электронной плотности достаточно хорошо интерпретируется.

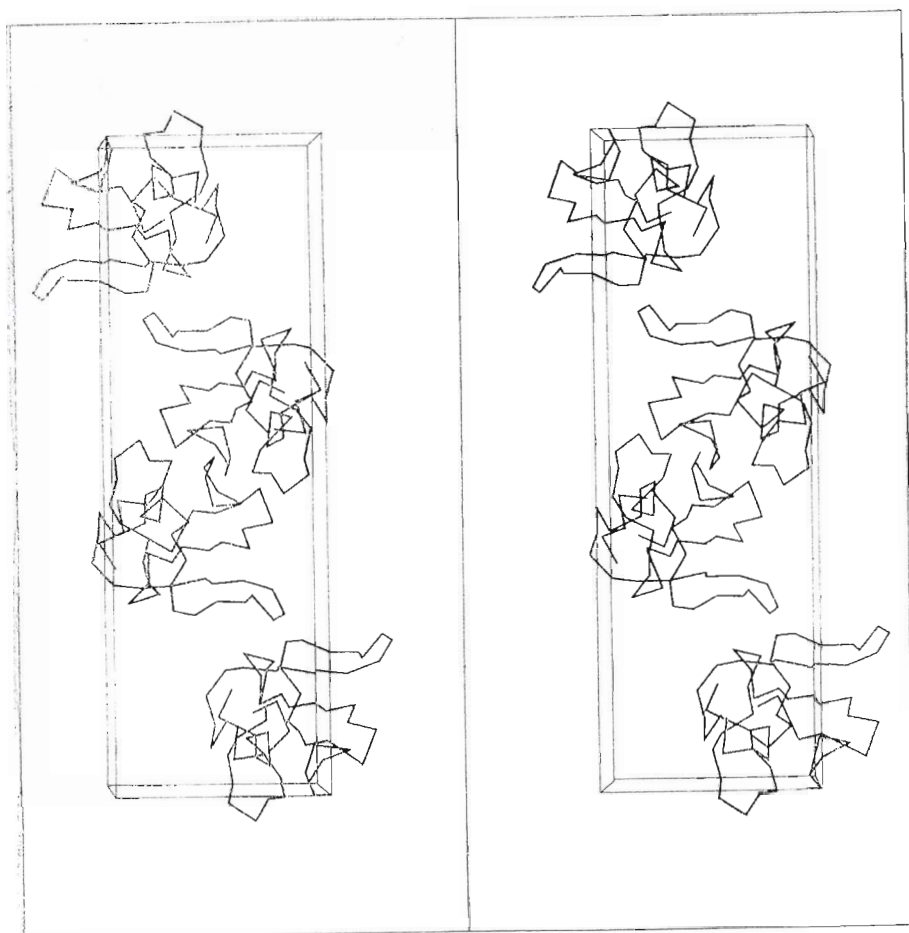


Рис. 2. Стереорепрезентация упаковки молекулы NTX-I в элементарной ячейке

Таким образом, с использованием в качестве стартовой модели молекулы СТХ определены в основном строение цепи молекулы NTX-I и ее укладка в элементарной ячейке кристалла. Ведется работа по дальнейшему уточнению строения молекулы NTX-I в кристаллическом состоянии.

Экспериментальная часть

Получение нейротоксина I. Для работы использовали яд среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana*, собранный и лиофилизированный в Каракалинском серпентарии (Туркменская ССР). Яд разделяли на колонке с сефакрилом S-200 Superfine (Pharmacia) в 0,05 М трис-сукцинатном буфере, pH 5,6 (20° С), содержащем 0,1 М NaCl. Фракции низкомолекулярных белков, сходящих с колонки вслед за рибонуклеазой, объединяли, доводили значения pH и проводимости до величины pH и проводимости буфера (0,05 М ацетат аммония, pH 4,5), в котором уравновешена колонка с СМ-целлюлозой СМ-32 (Whatman), и наносили на эту колонку. Элюции белков проводили в соответствии с условиями, описанными в работе [9]. Фракции (рис. 3а) анализировали с помощью диск-электрофореза в кислой буферной системе [10] в пластинах геля толщиной 1 мм. Концентрация акриламида в разделяющем геле составляла 15%, а соотношение акриламида и N,N'-метиленабисакриламида — 20 : 1. В концентрирующем же геле концентрация акриламида составляла 5% при том же соотношении акриламида и метиленабисакриламида. В качестве свидетелей использовали чистые препараты нейротоксинов, любезно предоставленные В. А. Коваленко и Т. М. Волковой (Институт биорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР).

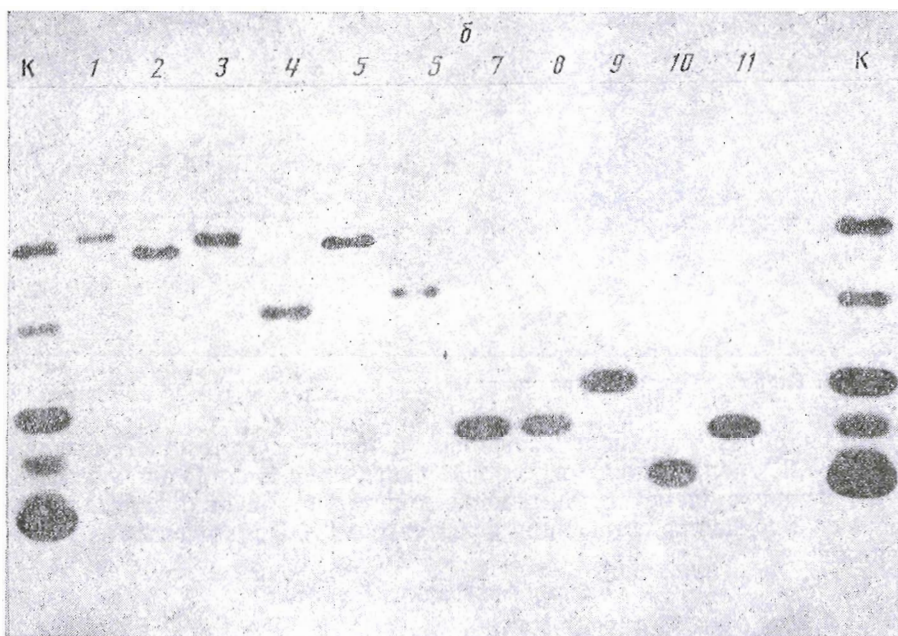
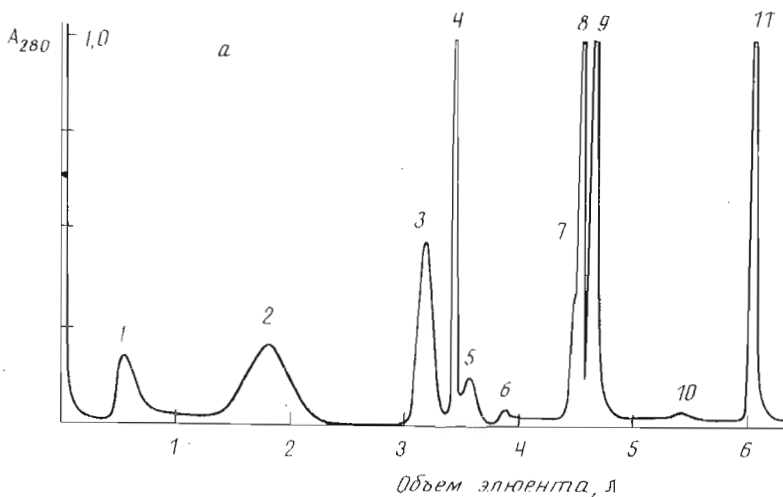


Рис. 3. Хроматография низкомолекулярных белков из яда кобры *Naja naja oxiana* на СМ-целлюлозе в градиенте концентрации и рН аммоний-ацетатного буфера [9] (а) и электрофоретический анализ полученных фракций в кислой буферной системе [10] (б). Номера образцов на фореграмме соответствуют номерам пиков на хроматограмме; где 1, 2, 3, 5 — изоферменты фосфолипазы A_2 ; 4 — нейротоксин I; 7, 8 — нейротоксин II; 9 — цитотоксин I; 10 — цитотоксин II; 6, 11 — неидентифицированные белки. К — белки-маркеры

Фракции, содержащие нейротоксин I, объединяли и лиофилизировали до практически полного удаления ацетата аммония. Очищенный препарат нейротоксина I был гомогенным, по данным электрофореза (рис. 3б), и обладал токсическим действием с $LD \leq 0,3$ мг/кг (определение токсичности проводили на 3-недельных белых мышах).

Кристаллизация NTX-I. Монокристаллы NTX-I получены методом диффузии в парах с использованием специально приготовленных для этой цели стеклянных лунок. Лиофильно высушенный препарат растворяли в 0,01 М CH_3COOH до концентрации 15—25 мг/мл. Противораствор содержал 50—55% изопропилового спирта и 5% 2-метил-2,4-пентадиола (Serva). Кристаллы появлялись через 1—3 нед и в отдельных случаях

Основные характеристики дифракционного эксперимента

Характеристика	Значение
Скорость сканирования обратного пространства, град/мин	1,0
Количество независимых отражений с $ F > \sigma$	3617
Количество независимых отражений с $ F > 3\sigma$	3600
Количество расчетных независимых отражений	3821
Стандартный R -фактор полного набора, $R = \sum \sigma_i / \sum F_i$, %	5,8

достигали размеров $3,0 \times 1,0 \times (0,08-0,2)$ мм³. Пространственная группа и параметры элементарной ячейки определены по прецессионным рентгенограммам и уточнены на четырехкружном дифрактометре Syntex P2₁. Дифракционное поле от таких кристаллов, как правило, можно было фиксировать с области до $1,9 \text{ \AA}^{-1}$. Упаковка молекул в кристалле может быть описана пространственной группой симметрии $P2_12_12$ с параметрами элементарной ячейки $a = 25,19$, $b = 75,59$, $c = 36,09 \text{ \AA}$. На независимую часть ячейки приходится одна молекула белка с массой 7,8 кДа, что соответствует удельному объему $2,2 \text{ \AA}^3/\text{Да}$. Это значение близко к центру интервала, характерного для кристаллов белков [11].

Сбор рентгенодифракционных данных. Интенсивности, дифрагированные кристаллом нативного белка, были измерены на четырехкружном дифрактометре Syntex P2₁ при температуре 20° С. Съемка производилась ω -методом с использованием $\text{Cu K}\alpha_1$ -излучения и графитового монохроматора. Процесс съемки осуществлялся в автоматическом режиме под контролем управляющих программ, написанных Ю. В. Некрасовым [12]. Полный набор интенсивностей в дифракционной области до $2,2 \text{ \AA}^{-1}$ собран с 6 кристаллов. Радиационный распад кристаллов за 70—90 ч составлял 15—17%. Обработка интегральных интенсивностей проводилась на ЭВМ NORD-500 по программам комплекса BLANC [13]. Основные данные эксперимента (после объединения наборов) приведены в табл. 3.

Авторы благодарят А. Б. Четверина и Л. В. Гнатышко за помощь в работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grishin E. V., Sukhikh A. P., Slobodyan L. N., Ovchinnikov Y. A., et al. // FEBS Lett. 1974. V. 45. N 2. P. 118—121.
2. Walkinshaw M. D., Saegner W., Maelicke A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. N5. P. 2400—2404.
3. Bernstein F. C., Koetzle T. F., Williams G. J. B. // J. Mol. Biol. 1977. V. 112. N 3. P. 535.
4. Crowther R. A. // The molecular replacement method / Ed. Rossmann M. E. N. Y.: Gordon and Breach, 1977. P. 173—178.
5. Lattman E. E., Nickolds C. E., Kretsinger R. H., Low W. E. // J. Mol. Biol. 1971. V. 60. N 2. P. 271—277.
6. Fitzgerald P. M. D. // J. Appl. Crystallogr. 1988. V. 21. N 3. P. 273—278.
7. Susman J. L., Holbrook S. R., Church G. M., Kim S.-H. // Acta cryst. 1977. A33. N 5. P. 800—804.
8. Hendrickson W. A., Konnert J. H. // Biomolecular structure, function, conformation and evolution. V. 1 / Ed. Srinivasan R. Oxford: Pergamon Press, 1981. P. 43.
9. Ансалон У. Р., Шамборант О. Г., Мирошников А. И. // Биооргани. химия. 1977. Т. 3. № 11. С. 1553—1559.
10. Reisfeld R. A., Lewis U. J., Williams D. E. // Nature. 1962. V. 195. N 3. P. 281—283.
11. Matthews B. W. // J. Mol. Biol. 1963. V. 33. N 3. P. 491—497.
12. Некрасов Ю. В. // Кристаллография. 1988. Т. 33. № 3. С. 795—797.
13. Вагин А. А. Использование некристаллографической симметрии в структурной кристаллографии белков. Дис. ... канд. физ.-мат. наук. М., Институт кристаллографии АН СССР, 1983.

Поступила в редакцию
25.V.1990

A. M. MIKHAILOV, A. V. NIKITENKO, E. V. CHETVERINA*, S. D. TRAKHANOV,
B. K. VAINSHTEIN

SPATIAL ORGANIZATION OF BACKBONE OF THE NEUROTOXIN
I MOLECULE FROM THE *NAJA NAJA OXIANA* VENOM AND ITS
CRYSTAL PACKING

Institute of Crystallography, Academy of Sciences of the USSR, Moscow:

* *Institute of Proteins, Academy of Sciences of the USSR,
Pushchino, Moscow Region*

The structure of the α -carbon chain was solved by molecular replacement method at 2.7 Å resolution. Neurotoxin I (NTX-I) is one of the main protein components purified from the venom of the central asian cobra *Naja naja oxiana*. NTX-I is known to bind specifically to acetylcholine receptors thus preventing the transmission of the neuroconductivity signal from synaps to muscles. NTX-I crystals were grown either by vapour diffusion or dialysis methods using specially prepared microdialysis cell. The intensities of reflections from native NTX-I crystals were measured in the range of 38.0—2.1 Å⁻¹ by ω -scan method with a Syntex P2₁ diffractometer operated in automatic regime. To determine the position and mode of packing of NTX-I molecule in unit cell program packages MERLOT and BLANC were applied running on a NORD-500 computer.