



УДК 541.14:535.37+591.145.2

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙРОТОКСИНА II ИЗ ЯДА КОБРЫ
Naja naja oxiana И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ
МЕТОДАМИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ. КОНФОРМАЦИЯ ФРАГМЕНТА
-Lys²⁵-Lys-Trp-Trp²⁸-

Сурин А. М., Уткин Ю. Н., Плужников Е. А.,
Ефремов Е. С., Цетлин В. И.

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

Методами флуоресценции проведено исследование нейротоксина II (NT-II) из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* и ряда его производных, в которых избирательно модифицированы остатки лизина. Установлено, что оба остатка триптофана (Trp²⁷ и Trp²⁸) имеют одинаковые спектры флуоресценции ($\lambda_{\text{макс}}$ 340 нм), близкие квантовые выходы и времена жизни возбужденного состояния. Измерения поляризации флуоресценции NT-II и его даксилитированного производного [Lys²⁶(Dns)]NT-II свидетельствуют о том, что форма молекул токсина в растворе значительно отличается от сферической. Исследовано влияние pH на форму и интенсивность полосы флуоресценции NT-II и серии его моноацетильных и моноспин-меченных производных; показано, что индольное кольцо Trp²⁸ сближено со спиновой меткой на Lys²⁶ до 0,4–0,6 нм, индольное кольцо Trp²⁷ находится на таком же расстоянии от спиновой метки на Lys²⁵, а расстояние между индольными кольцами Trp²⁷ и Trp²⁸ не менее 0,9 нм. По результатам измерения эффективности миграции энергии, даксильная и трипнитрофенильная группа при Lys²⁶ находятся на расстоянии 1,3–1,4 нм от индольного кольца Trp²⁷ и не далее 1 нм от индольного кольца Trp²⁸.

Полученные данные о расстояниях между боковыми цепями соседних остатков Trp и Lys согласуются с β -структурной конформацией центрального участка полипептидной цепи, включающего фрагмент -Lys²⁵-Lys-Trp-Trp²⁸-.

Нейротоксины из яда змей, действующие на постсинаптическую мембрану, блокируют передачу нервного импульса, специфически взаимодействуя с ацетилхолиновым рецептором [1, 2]. Необходимым этапом исследования природы этого взаимодействия является выяснение функционально важных аминокислотных остатков нейротоксинов и их взаимного расположения. В число функционально важных входит инвариантный для разных токсинов остаток Trp²⁹ (нумерация по [3]), который, согласно существующим представлениям [2], принимает непосредственное участие либо в связывании с рецептором, либо в формировании необходимой конформации фрагмента молекулы токсина, связывающего рецептор.

Флуоресценция остатков триптофана в белках весьма чувствительна к окружению индольного флуорофора [4, 5], благодаря чему инвариантный остаток триптофана может служить естественной репортерной группой при изучении нейротоксинов. Это обстоятельство использовалось, в частности, для выяснения влияния органических растворителей [6–8] и де-

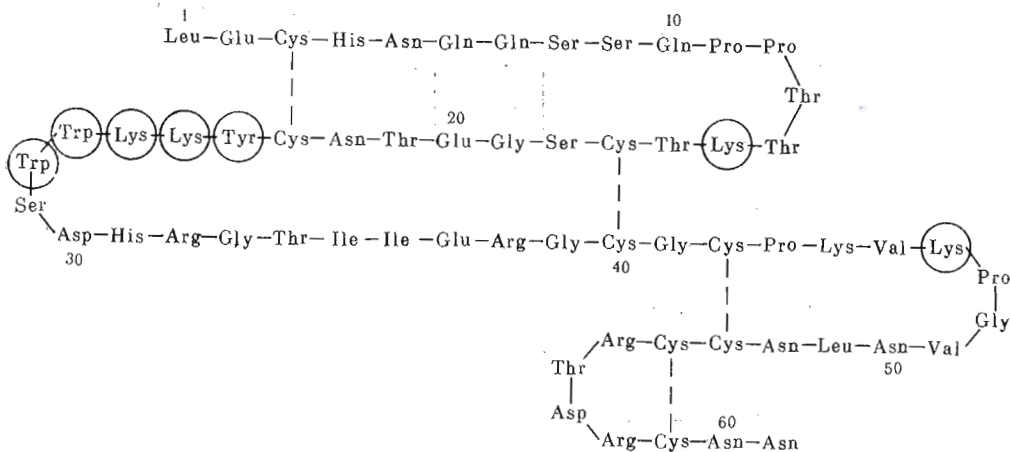


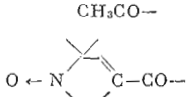
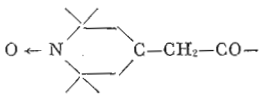
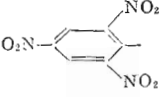
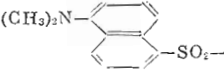
Рис. 1. Аминокислотная последовательность NT-II *Naja naja oxiana* [12]. Выделены ароматические аминокислотные остатки, а также модифицированные остатки Lys

натурирующих агентов [8, 9] на конформационную стабильность коротких токсинов. Наиболее подробное флуоресцентное исследование окружения остатков триптофана в нейротоксинах было выполнено Буколовой-Орловой с соавт. [10, 11] на примере «короткого» (61 аминокислотный остаток) и «длинного» (73 остатка) токсинов из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana*, имеющих по 2 остатка триптофана. Было показано, что эти остатки находятся на поверхности белка и что вблизи от них расположены положительно заряженные группы, эффективный заряд которых выше в случае «длинного» токсина.

В данной работе проведено сравнительное изучение методами флуоресценции «короткого» нейротоксина из яда среднеазиатской кобры — нейротоксина II (NT-II), первичная структура которого представлена на рис. 1 [12], и серии его производных, в которых в идентифицированные участки молекулы введены ацетильные группы, а также флуоресцентные и тушащие метки (табл. 1). Сопоставление флуоресценции нативного токсина и его производных позволило не только более детально охарактеризовать микроокружение остатков триптофана, но и получить дополнительные сведения о конформации триптофансодержащего фрагмента.

Флуоресценция NT-II и его моноацетильных и моноспин-меченных производных. Спектры флуоресценции нативного токсина (рис. 2), полученные при возбуждении на 280 и 298 нм, имеют максимум при 340 ± 1 нм и при нормировании по интенсивности при 380 нм совпадают вплоть до 305 нм. Отсюда следует, что флуоресценция NT-II обусловлена излучением остатков триптофана, а единственный остаток тирозина не флуоресцирует. Тушение флуоресценции остатка тирозина может быть вызвано участием гидроксила боковой цепи в водородной связи и/или расположением этого остатка внутри белка и, как следствие, сближенностью фенольного флуорофора с тушащими группами белка [4]. Такое объяснение согласуется с данными спектрофотометрического титрования [13] и $^1\text{H-NMR}$ [14] рассматриваемого токсина. Более коротковолновое положение полосы флуоресценции остатков триптофана в NT-II по сравнению с флуоресценцией этой аминокислоты в воде (рис. 2, табл. 2) свидетельствует о сближенности индольных колец с боковыми цепями других аминокислотных остатков. Избирательное ацетилирование, равно как и введение спиновых меток, не влияет на положение и форму полосы флуоресценции (рис. 2, табл. 2). Квантовый выход флуоресценции (q) NT-II, напротив, сильно падает при введении спиновых меток. Наблюдаемое тушение не связано с заменой ϵ -аминогрупп остатков Lys²⁵ и Lys²⁶ на амид-

Производные нейротоксина II

Введенная группа	Порядковый номер модифицированного остатка	Обозначение соответствующего производного
	15	[Lys ¹⁵ (Ac)]NT-II
	25	[Lys ²⁵ (Ac)]NT-II
	26	[Lys ²⁶ (Ac)]NT-II
	46	[Lys ⁴⁶ (Ac)]NT-II
	26	[Lys ²⁶ (SL)]NT-II
	25	[Lys ²⁵ (SL')]NT-II
	26	[Lys ²⁶ (Tnp)]NT-II
 Dns-Gly	26	[Lys ²⁶ (Dns)]NT-II
	26 46*	[Lys ²⁶ (Dns-Gly)]NT-II [Lys ⁴⁶ (Dns-Gly)]NT-II

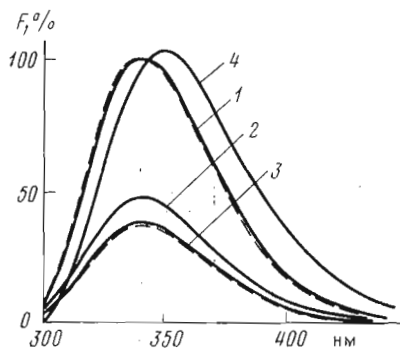
* Остаток Lys²⁶ ацетилирован.

ные, поскольку ацетилирование тех же остатков практически не сказывается на квантовом выходе. В отличие от q времена жизни возбужденного состояния (τ) индольных флуорофоров совпадают как у нативного, так и спин-меченных аналогов (табл. 2). Сильное тушение при неизменной длительности флуоресценции может быть связано с образованием нефлуоресцирующих комплексов между спиновыми метками и индольными кольцами остатков триптофана. Возможно, образованием таких комплексов и соответственно понижением подвижности иминоксильных радикалов обусловлено уширение спектров ЭПР спиновых меток на остатках Lys²⁵ и Lys²⁶ по сравнению со спектрами меток на Lys¹⁵, Lys⁴⁴ и Lys⁴⁶ [16]. Расположение спиновых меток на остатках Lys²⁵ и Lys²⁶ относительно индольных колец Trp²⁷ и Trp²⁸ становится ясным из рассмотрения pH-зависимости флуоресценции нативного токсина и его ацетилированных и спин-меченных производных.

Влияние pH на флуоресценцию NT-II и его производных. При исследовании влияния pH раствора на флуоресценцию NT-II, α -токсина *Naja nigricollis* и производного NT-II, в котором все аминогруппы трифторацетилированы, было установлено [14], что кривая зависимости интенсивности флуоресценции от pH отражает титрование имидазольного кольца, принадлежащего His³¹ [17], карбоксильной группы (групп), а также одной или нескольких аминогрупп. Идентификация этой аминогруппы осуществлена в настоящей работе при исследовании влияния pH на флуоресценцию производных NT-II (рис. 3, табл. 2).

Ацетилирование заметно влияет на вид кривой титрования только при модификации остатка Lys²⁶. В щелочной области pH тушение флуоресценции производного [Lys²⁶(Ac)]NT-II наблюдается при значениях pH примерно на 1 больше, чем для нативного токсина. Сдвиг кривой титрования для [Lys²⁶(Ac)]NT-II по сравнению с немодифицированным белком в кислой области обусловлен, вероятно, тем, что ацетилирование ϵ -амино-

Рис. 2. Корректированные спектры флуоресценции (I — интенсивность флуоресценции) NT-II (1), $[\text{Lys}^{25}(\text{SL}')\text{NT-II}$ (2), $[\text{Lys}^{26}(\text{SL}')\text{NT-II}$ (3) в 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,5, и Trp в воде (4). Спектры получены при возбуждении на длине волны 280 (сплошные линии) и 298 нм (пунктир) и нормированы по интенсивности при 380 нм. Центральная ширина щелей монохроматоров возбуждения и эмиссии 5 нм. Площади под кривыми пропорциональны квантовым выходам. Концентрация белков 0,03 мг/мл



группы Lys^{26} сдвигает влияние ее положительного заряда на рК соседней карбоксильной группы. Последняя, согласно данным ЯМР [14], находится вблизи индольного кольца Trp^{28} . Можно предположить, что боковая цепь остатка Lys^{26} также сближена с Trp^{28} .

Это предположение подтверждается результатами рН-титрования спин-меченных производных NT-II (рис. 3б). Для $[\text{Lys}^{26}(\text{SL}')\text{NT-II}$ практически полностью исчезает переход, отвечающий титрованию имидазола гистидинового остатка, а в щелочной области наблюдается такой же ход кривой титрования, как в случае $[\text{Lys}^{26}(\text{Ac})\text{NT-II}$. Для $[\text{Lys}^{25}(\text{SL}')\text{NT-II}$, напротив, полностью сохраняется участок кривой рН-титрования, отвечающий ионизации имидазола, и не наблюдается отличий от NT-II в щелочной области рН. К сожалению, не удается сопоставить кривые титрования спин-меченных производных при $\text{pH} < 5$, поскольку в кислой области наблюдается непрерывный рост интенсивности флуоресценции, вызванный, вероятно, восстановлением иминоксильных радикалов. Влияние спиновых меток на ход кривой рН-титрования мы объясняем следующим образом: а) боковая цепь Lys^{26} сближена с индольным кольцом Trp^{28} , благодаря чему иминоксильный радикал полностью тушит флуоресценцию этого остатка, соответственно на кривой титрования исчезает участок титрования His^{31} и не наблюдается титрования аминоксильной группы; б) боковая цепь Lys^{25} сближена с индольным кольцом Trp^{27} и тушит только его флуоресценцию, вследствие чего вид кривой, отвечающий изменению флуоресценции Trp^{25} , сохраняется. «Запаздывание» кривых рН-титрования модифицированных по Lys^{26} производных по сравнению с нативным NT-II в щелочной области (рис. 3б) вызвано, вероятно, тем, что аминоксильная группа в нейтральной форме является более эффективным тушителем флуоресценции триптофана, чем в заряженной (табл. 12 в [4]). Поэтому модификация Lys^{26} приводит к тому, что на кривой, отражающей тушащее действие ϵ -аминогруппы остатка Lys^{26} на флуоресценцию Trp^{28} , исчезает участок, отвечающий началу деионизации этой аминоксильной группы. Тушение флуоресценции при $\text{pH} > 10$ обусловлено ионами OH^- [14].

Отметим, что, хотя исследование флуоресценции спин-меченных производных указывает на сближенность боковых цепей Trp^{27} и Lys^{25} , ацетилирование последнего не изменяет кривой рН-зависимости флуоресценции токсина в щелочной области (рис. 3а), как это наблюдается при ацетилировании Lys^{24} (рис. 3б). По-видимому, ϵ -аминогруппа остатка Lys^{25} имеет высокое значение рК, по крайней мере большее, чем рК Lys^{26} . Правомочность такого предположения подтверждается данными ^{19}F -ЯМР для гексафторацетилированного производного NT-II [18], согласно которым вблизи Lys^{25} расположена карбоксильная группа с $\text{pK} \approx 1,3$. Близкое расположение отрицательно заряженной группы может, естественно, проявляться в увеличении рК ϵ -аминогруппы Lys^{25} . Возможно также, что ϵ -аминогруппа Lys^{25} находится на несколько большем расстоянии от индольного кольца Trp^{27} , чем в случае пары Lys^{26} — Trp^{28} , однако это расстояние

Параметры флуоресценции NT-II и его моноацетилированных и моноспин-меченных производных

Образец	Максимум флуоресценции, нм	Квантовый выход при $\lambda_{возб}$, нм		Время жизни возбужденного состояния, нс	$pK_{1/2}^{**} \pm 0,1$ ($COO^- \rightleftharpoons COOH$)	$pK_{2/2}^{**} \pm 0,1$ ($Im^- \rightleftharpoons Im$)	Константа тушения K_{sp} иодидом, M^{-1}
		280	298				
NT-II	340±1	0,17±0,02	0,16±0,2	2,0±0,2	4,1	5,9	4,7±0,5
[Lys ¹⁵ (Ac)]NT-II	340±1		0,16±0,03		4,2	6,0	3,5±0,3
[Lys ²⁵ (Ac)]NT-II	340±1		0,18±0,02		4,2	6,1	4,5±0,3
[Lys ²⁶ (Ac)]NT-II	340±1		0,14±0,03		4,4	6,1	4,4±1,0
[Lys ⁴⁶ (Ac)]NT-II	340±1		0,15±0,04		4,1	6,0	4,0±0,5
[Lys ²⁵ (SL')]NT-II	340±1	0,077±0,006	0,073±0,005	1,9±0,2		5,8	
[Lys ²⁶ (SL)]NT-II	340±1	0,060±0,006	0,058±0,003				
[Lys ²⁶ (SL')]NT-II	340±1	0,071±0,006	0,061±0,006				
Trp	350	0,20 *	0,20 *	3,2±0,2			12,7±1,0

* Данные работы [15].

** pK определяли как точки перегиба на кривых, приведенных на рис. 3.

достаточно для того, чтобы спиновая метка на Lys²⁵ «дотягивалась» до индольного кольца Trp²⁷.

Практически полное тушение спиновыми метками флуоресценции соответствующих остатков триптофана подтверждается тем, что сумма квантовых выходов спин-меченных производных NT-II почти совпадает с квантовым выходом нативного токсина (табл. 1). В случае неполного тушения сумма превосходила бы значение q исходного белка.

При исследовании влияния вязкости на процессы тушения флуоресценции ряда ароматических молекул ди-*трет*-бутилнитроксидом было установлено, что тушение реализуется на расстояниях 0,4–0,6 нм [19]. Предполагается, что такие же расстояния требуются для эффективного тушения спиновым зондом флуоресценции остатков триптофана в белке [20].

Сопоставление квантовых выходов, времен жизни и pH-зависимостей флуоресценции нативного токсина, его ацетилированных и спин-меченных аналогов приводит к заключению: а) спиновая метка на Lys²⁵ сближена на 0,4–0,6 нм с боковой цепью Trp²⁷, но не влияет на флуоресценцию Trp²⁸, т. е. удалена от индольного кольца этого остатка более чем на 0,6 нм; б) боковые цепи Lys²⁶ и Trp²⁸ находятся на расстоянии 0,4–0,6 нм.

Поскольку боковые цепи остатков триптофана и по крайней мере двух остатков лизина сближены, естественно предположить, что заряды ϵ -аминогрупп последних (при $pH < pK_{Lys}$) вносят определенный вклад в общее зарядовое окружение остатков триптофана в NT-II. Достаточно простым методом, позволяющим оценить зарядовое окружение остатков триптофана, является тушение флуоресценции белка ионными тушителями [5].

Тушение флуоресценции NT-II и его моноацетильных производных ионами иода. Было установлено [10], что флуоресценция NT-II тушится иодид-ионами и очень слабо — ионами Cs⁺, что говорит о локализации небольшого положительного заряда вблизи остатков триптофана. Полученные нами константы тушения флуоресценции NT-II и его производных иодидом близки между собой (табл. 2) и несколько выше значения, приведенного для NT-II в работе [10], что, однако, не изменяет выводов упомянутой работы о характере зарядового окружения остатков триптофана. Для зондирования зарядового окружения этих остатков применялась также дифференциальная методика, когда в одну из кювет помещали раствор NT-II при pH 7,5, а в другую при pH 4,5 либо раствор [Lys²⁶(Ac)]NT-II

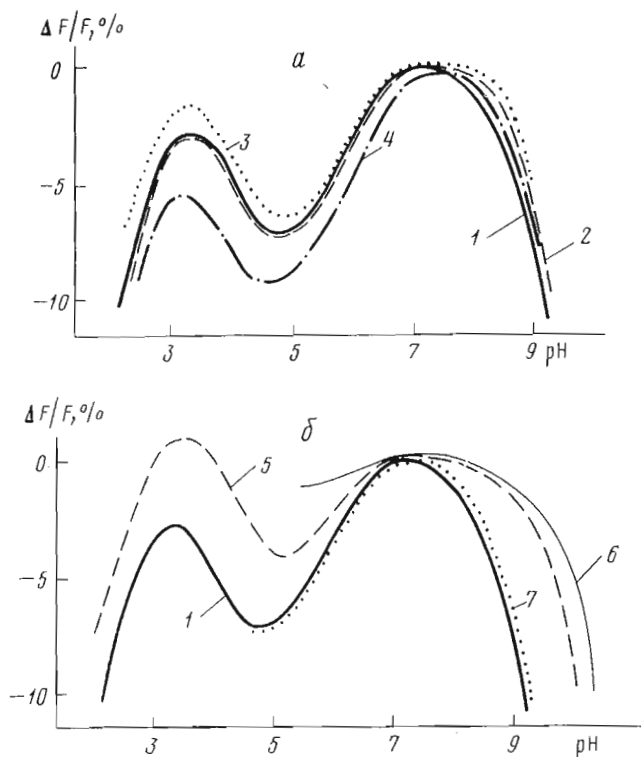


Рис. 3. Кривые дифференциального флуоресцентного pH-титрования. а: 1 — NT-II, 2 — [Lys¹⁵(Ac)]NT-II, 3 — [Lys²⁵(Ac)]NT-II, 4 — [Lys⁴⁶(Ac)]NT-II; б: 1 — NT-II, 5 — [Lys²⁶(Ac)]NT-II, 6 — [Lys²⁶(SL')]NT-II, 7 — [Lys²⁵(SL')]NT-II. F и ΔF — интенсивность флуоресценции и ее относительное изменение соответственно. $\lambda_{\text{возб}}$ 280 нм, $\lambda_{\text{изл}}$ 340 нм. Концентрация белков 0,05–0,1 мг/мл в 0,1 М NaCl, исходное значение pH 7,0–7,5

при pH 7,5 и в обе кюветы добавляли одинаковые объемы 3 М раствора KI. Ни в одном из этих экспериментов не наблюдалось возникновения разностного спектра. По-видимому, химическая модификация ϵ -аминогруппы Lys²⁶ несущественно изменяет величину суммарного заряда вокруг остатка Trp²³. Возможно, заметную роль в формировании этого заряда играют и другие остатки Lys и/или Arg.

Отметим, что, согласно данным ЯМР [21], имидазольное кольцо His³¹ при переходе в заряженное состояние удаляется от иминоксильного радикала на Lys³⁵ и, вероятно, от индольного кольца Trp²⁸. Это может приводить к уменьшению вклада His³¹ в общее зарядовое окружение Trp²⁸ и позволяет объяснить примерно 10-кратное снижение тушащего эффекта ионизованного имидазольного кольца, наблюдаемое при pH-титровании NT-II (рис. 3), по сравнению с модельными соединениями [22].

Таким образом, остатки триптофана в токсине имеют одинаковые спектры флуоресценции и практически совпадающие значения q и t . Зарядовое окружение этих остатков в целом электронейтрально, либо имеется небольшое преобладание положительного заряда. Поэтому мы не видим необходимости привлекать эффективный резонансный обмен энергией между индольными флуорофорами для объяснения монокомпонентного характера спектра флуоресценции NT-II, как это было сделано в работах [10, 11].

Более того, квантовые выходы флуоресценции спин-меченных производных NT-II практически одинаковы как при возбуждении в максимуме

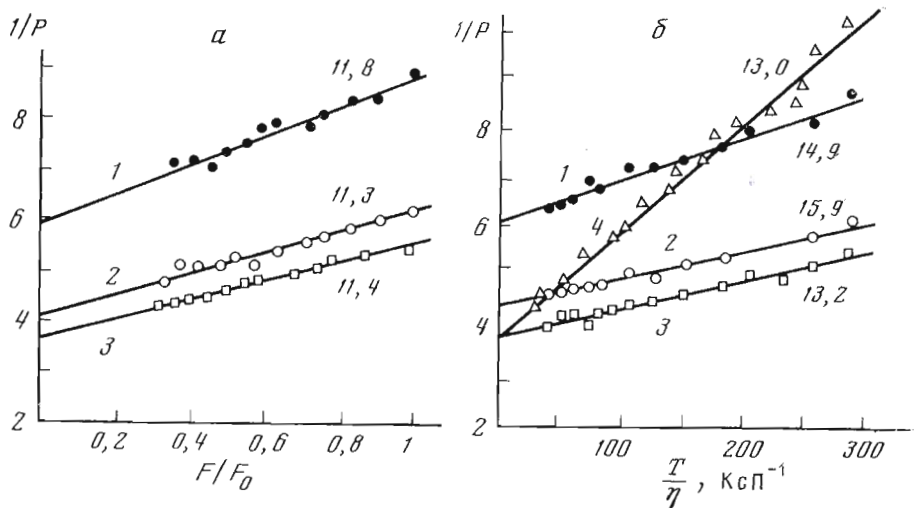


Рис. 4. Зависимость обратной степени поляризации флуоресценции ($1/P$) растворов NT-II (1–3) и $[\text{Lys}^{26}(\text{Dns})\text{NT-II}$ (4) от относительной интенсивности флуоресценции (а) и от отношения абсолютной температуры к вязкости (б). $\lambda_{\text{возб}}$ (нм): 1 – 280, 2 – 298, 3 – 305, 4 – 330. Концентрация белков $\sim 0,1$ мг/мл в $0,01$ М фосфатном буфере (рН 7,5), $0,1$ М NaCl. Флуоресценция остатков Trp регистрировалась при 350 нм и Dns-метки при 550 нм. Возле прямых указаны рассчитанные из графиков времена вращательной релаксации в нс (см. «Экспериментальную часть»)

полосы поглощения (280 нм), так и на длинноволновом крае полосы (298 нм) (табл. 2). В случае межтриптофанового обмена энергией квантовые выходы спин-меченных производных были выше при возбуждении на длинноволновом спаде полосы поглощения, когда гомоперенос энергии не происходит [23], по сравнению с возбуждением в максимуме полосы поглощения. В последнем случае можно было бы обнаружить перепоc энергии между остатками триптофана, так как затухенный спиновой меткой остаток триптофана является «ловушкой» мигрирующей на него энергии, т. е. нефлуоресцирующим акцентором энергии. По той же причине гомоперенос энергии приводил бы к снижению времени жизни триптофановой флуоресценции в спин-меченных производных по сравнению с нативным NT-II, чего, однако, не наблюдается (табл. 2).

Время вращательной релаксации и поляризация флуоресценции NT-II. Перенос энергии между одинаковыми хромофорами, в частности между остатками триптофана в белках, можно обнаружить, исследуя поляризацию флуоресценции [24, 25].

Тил и Бадли на примере пепсина и пепсиногена показали [26], что при возбуждении флуоресценции вблизи максимума полосы поглощения межтриптофановый перенос энергии приводит к кажущемуся понижению времени вращательной релаксации белка (ρ), если оно находится из зависимости поляризации флуоресценции остатков триптофана от времени жизни возбужденного состояния. При возбуждении флуоресценции на длинноволновом крае полосы поглощения ($\lambda_{\text{возб}} \geq 300$ нм) значения ρ были значительно выше и совпадали с величинами, найденными из зависимости поляризации флуоресценции от вязкости раствора.

В случае NT-II выбор $\lambda_{\text{возб}}$ не влияет на значения ρ , найденные из зависимости поляризации от интенсивности флуоресценции (рис. 4а). Времена релаксации, полученные из поляризационных измерений растворов с возрастающей вязкостью (рис. 4б, расчет см. в «Экспериментальной части»), близки к значениям, найденным при добавлении тушителя (3 М раствор KI), и совпадают как при измерении собственной флуоресценции белка, так и флуоресценции Dns-метки (в производном $[\text{Lys}^{26}(\text{Dns})\text{NT-II}$ для Dns-группы τ 7,4 нс).

Полученные значения ρ были сопоставлены с расчетными. Если бы молекула нейротоксина имела шарообразную форму, то в соответствии с законом Стокса — Эйнштейна время вращательной релаксации (ρ_0) для такой частицы в воде при 20° С и мольном объеме V_0 , равном 4,73 см³/моль (рассчитан по парциальным удельным объемам аминокислот [27]), было бы равно 5,85 нс. В растворе белок связывает некоторое количество воды (табл. 22 и 23 в [28]), которая транспортируется макромолекулой при броуновском движении, что в свою очередь приводит к увеличению времени вращательной релаксации белка [29]. С учетом связанной воды ρ_0 равно 9,05 нс, т. е. заметно меньше значений, приведенных на рис. 4. Следовательно, форму молекулы нейротоксина нельзя аппроксимировать сферой. Если предположить, что молекулы NT-II имеют форму эллипсоида вращения, то превышение экспериментальных значений (рис. 4б) в 1,4—1,8 раза по сравнению с расчетным ρ_0 соответствует вытянутому эллипсоиду вращения с соотношением осей 2,5—3,9 либо сплюснутому эллипсоиду вращения с соотношением осей 2,5—3,4 [30].

Нейротоксин II гомологичен эрабутоксину *b*, молекулы которого в кристалле можно рассматривать как эллипсоид с осями 3,8×2,8×1,5 нм [31], т. е. имеют форму, напоминающую сплюснутый эллипсоид вращения с соотношением длинной и короткой осей (2,5), близким к идеальному для NT-II в растворе.

По результатам, полученным Вебером при исследовании зависимости поляризации флуоресценции от длины волны возбуждающего света (возбуждение неполяризованным светом) для индола и индолсодержащих низкомолекулярных соединений в застеклованных растворах (исключающих вращательную деполаризацию), отношение степеней поляризации при возбуждении на 305 и 280 нм колеблется от 1,7 до 2,2 [24], тогда как для 9 из 10 исследованных им белков также в застеклованных растворах это отношение больше 3 [25]. Увеличение отношения степеней поляризации в белках по сравнению с модельными соединениями связано, по крайней мере отчасти, с миграцией энергии между остатками триптофана в белках. Для NT-II отношение предельных степеней поляризации (P_0^{315}/P^{280})_p = 1,6 (рис. 4а и б), что в пересчете на возбуждение неполяризованным светом ($P_n = P_p / (2 - P_p)$), где индексы *n* и *p* означают естественный и поляризованный свет [32]) составляет 1,7.

Таким образом, в результате исследования зависимости квантового выхода син-меченных производных и степени поляризации флуоресценции нативного токсина от длины волны возбуждающего света, а также из сопоставления времени жизни флуоресценции NT-II и син-меченных производных не удалось обнаружить резонансного обмена энергией остатков триптофана. Можно полагать, что в данном случае, если миграция энергии между остатками и существует, то эффективность этого процесса не превышает 0,1, т. е. той величины, которая доступна измерению [33]. Это означает, что расстояние между центрами индольных колец Trp²⁷ и Trp²⁸ в молекуле NT-II составляет не менее 0,9—1,2 нм, если принять критический радиус межтриптофанового переноса энергии в белке равным 0,7—0,9 нм [34].

Из молекулярных моделей было найдено, что максимально возможное расстояние между центрами индольных колец для последовательности -Trp-Trp- составляет 1,3—1,4 нм.

Флуоресценция Dns- и Trp-производных нейротоксина, флуоресцентный перенос энергии. Спектры эмиссии флуоресценции Dns-метки в производных NT-II имеют положение максимума (рис. 5) и квантовые выходы (табл. 3), характерные для дансильного хромофора в полярном окружении [35]. Несколько более коротковолновое положение полос флуоресценции Dns-группы в производных токсина по сравнению с флуоресценцией Dns-Leu в воде указывает на взаимодействие метки с боковыми цепями белка, причем это взаимодействие ослабевает при удалении

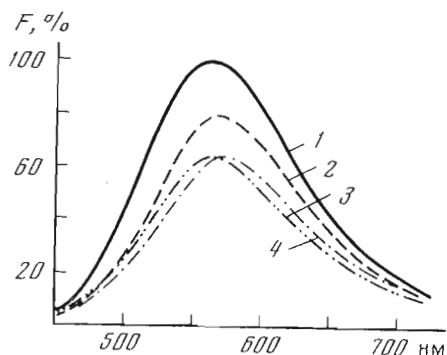


Рис. 5. Корректированные спектры флуоресценции: 1 — [Lys²⁶(Dns)]NT-II, 2 — [Lys²⁶(Dns-Gly)]NT-II, 3 — [Lys⁴⁶(Dns-Gly)]NT-II, 4 — Dns-Leu; 0,1 M NaCl, pH 5,6, концентрация белков 0,03 мг/мл, $\lambda_{\text{возб}}$ 330 нм. Площади под кривыми пропорциональны квантовым выходам

ее от пептидной цепи белка в производном, содержащем глициновый спейсер.

Флуоресценция остатков Trp в Dns- и Trp-меченных производных NT-II сильно затухает по сравнению с нативным токсином (табл. 3). Учитывая перекрывание спектров поглощения Dns- и Trp-хромофоров с полосой эмиссии NT-II (рис. 6), снижение квантовых выходов флуоресценции триптофанилов естественно объяснить диполь-дипольным резонансным переносом энергии с возбужденных индольных хромофоров на метки. Однако эффективность миграции энергии (E), вычисленная по понижению квантового выхода флуоресценции остатков триптофана, существенно выше эффективности, вычисленной по увеличению квантового выхода флуоресценции Dns-метки (табл. 3). Отсюда следует, что тушение флуоресценции остатков триптофана нельзя объяснить только диполь-дипольным резонансным переносом энергии на акцептор [36]. Различия в величинах E могут быть вызваны тем, что введение Dns- или Trp-метки изменяет конформацию белка таким образом, что возникает дополнительное, кроме переноса энергии, тушение флуоресценции, например за счет сближения индольных колец с тушащими группами белка. Однако присоединение к молекуле токсина Dns- и Trp-меток, равно как и ацилирование или введение спиновых меток, не влияет на положение и полуширину спектра флуоресценции остатков триптофана (рис. 2 и 6). Кроме того, спектры кругового дихроизма (КД) Dns- и Trp-меченных производных NT-II (рис. 7) лишь незначительно отличаются от спектров нативного токсина в области поглощения как пептидных, так и ароматических хромофоров.

Ранее было показано, что даже полное ацилирование всех аминокрупп NT-II не приводит к существенному изменению конформации белка в целом и окружения ароматических остатков в частности [18]. Таким образом, сильное тушение флуоресценции триптофанилов в Dns- и Trp-производных NT-II вряд ли обусловлено опосредованным влиянием этих меток на окружение остатков Trp. На наш взгляд, наиболее вероятная причина расхождения величин E , найденных по тушению триптофилов и сенсбилизации флуоресценции Dns-метки, состоит в том, что помимо

Таблица 3

Флуоресцентный перенос энергии в Dns- и Trp-производных нейротоксина II

Образец	Квантовый выход		Эффективность переноса энергии	
	$\lambda_{\text{возб}}$ Trp 295 нм	$\lambda_{\text{возб}}$ Dns 330 нм	тушение Trp	сенсбилизация Dns
[Lys ²⁶ (Dns)]NT-II	0,007	0,14±0,02	0,96	0,52±0,04
[Lys ²⁶ (Dns-Gly)]NT-II	0,009	0,11±0,02	0,94	0,50±0,04
[Lys ⁴⁶ (Dns-Gly)]NT-II	0,026	0,09±0,02	0,88	0,48±0,04
[Lys ²⁶ (Trp)]NT-II	0,003	—	0,98	—
NT-II	0,16	—	—	—

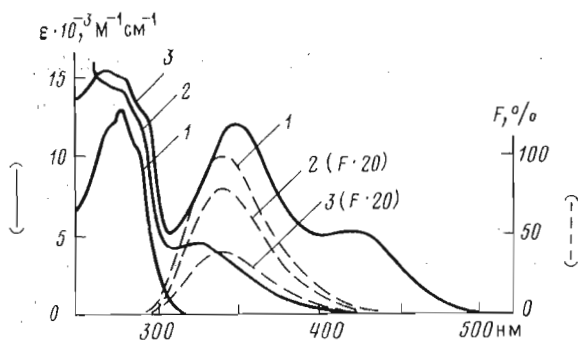


Рис. 6. Спектры поглощения и флуоресценции: 1 — NT-II, 2 — [Lys²⁶(Dns)]NT-II, 3 — [Lys²⁶(Trp)]NT-II. Условия как на рис. 1, $\lambda_{\text{возб}}$ 295 нм

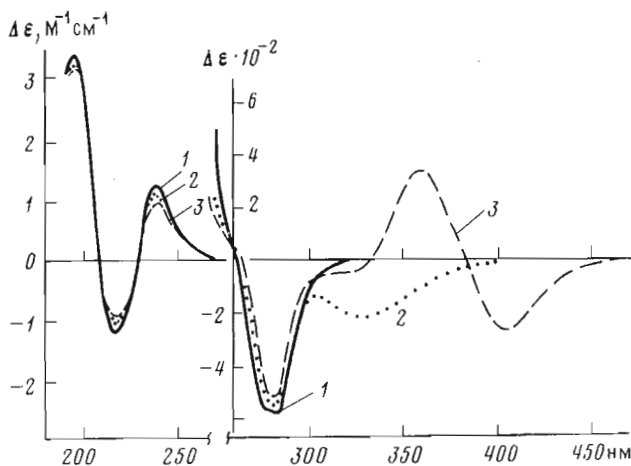


Рис. 7. Спектры КД: 1 — NT-II, 2 — [Lys²⁶(Dns)]NT-II, 3 — [Lys²⁶(Trp)]NT-II. Концентрация белков 0,5 мг/мл, 0,01 М фосфатный буфер, pH 7,5

диполь-дипольного имеют место мультипольные и обменные взаимодействия между этими хромофорами [37], как это было отмечено для донорно-акцепторной пары Trp — Dns при расстояниях между индольным кольцом и Dns-группой $\leq 1,0$ нм [36, 38]. Очевидно, по крайней мере в случае модификации остатка Lys²⁶, Dns- и Trp-группы, так же как и иминоксильный радикал на том же остатке Lys²⁶, сближены с Trp²⁸ и практически нацело тушат его флуоресценцию. Если предположить, что тушение флуоресценции остатка Trp²⁷ осуществляется только по резонансному механизму, причем квантовый выход флуоресценции этого остатка в отсутствие миграции энергии такой же, как в [Lys²⁶(SL)]NT-II, то остаток Trp²⁷ можно рассматривать как единственный донор энергии. В соответствии с теорией диполь-дипольного переноса энергии [39] по величине E можно найти расстояние (R), разделяющее донор и акцептор:

$$R = R_0 (1/E - 1)^{1/6}.$$

Здесь R_0 — расстояние, при котором эффективность переноса энергии равна 0,5:

$$R_0 = (JK^2 q_0 n^{-4})^{1/6} \cdot 9,79 \cdot 10^2 \text{ (нм)},$$

где q_0 — квантовый выход флуоресценции донора в отсутствие переноса энергии; n — показатель преломления среды на длине волны возбуждения; K^2 — фактор, учитывающий относительную ориентацию дипольных моментов перехода донора и акцептора; J — интеграл перекрытия спектров

Перенос энергии с индольного флуорофора Trp²⁷ на Dns- и Trp-метки при Lys²⁶

Донорно-акцепторная пара	Квантовый выход * Trp ²⁷		Эффективность миграции энергии, E	R ₀ **, нм, при K ² , равном		R, нм, при K ² , равном	
	q ₀	q		2/3	0,476	2/3	0,476
Trp ²⁷ – Lys ²⁶ (Dns)	0,12	0,014	0,88	1,92	1,83	1,37	1,31
Trp ²⁷ – Lys ²⁶ (Trp)	0,12	0,006	0,95	2,29	2,17	1,40	1,33

* Удвоенные значения квантовых выходов Trp²⁷ в [Lys²⁶(SL')]_{NT-II} (табл. 1), [Lys²⁶(Dns)]_{NT-II} и [Lys²⁶(Trp)]_{NT-II} (табл. 3), поскольку на этот остаток приходится лишь половина света, поглощаемого Trp²⁷ и Trp²⁸ при λ_{возб} 295 нм.

** Показатель преломления среды принимали равным 1,5, как рекомендуется для спектральной области, в которой поглощают ароматические аминокислоты [33].

ров флуоресценции донора и поглощения акцептора:

$$J = \frac{\int F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int F(\lambda) d\lambda} (\text{M}^{-1} \cdot \text{см}^3),$$

где $F(\lambda)$ и $\varepsilon(\lambda)$ — интенсивность флуоресценции донора (отн. ед.) и молярный коэффициент экстинкции акцептора ($\text{M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) на длине волны λ (см).

Относительные ориентации донора и акцептора, как правило, неизвестны, и поэтому параметр K^2 в принципе может иметь любые значения в интервале от 0 до 4, внося тем самым неопределенность в расчет R_0 . Наиболее часто используются значения $K^2=2/3$, когда относительная ориентация донора и акцептора становится полностью изотропной за время жизни в возбужденном состоянии, или $K^2=0,476$, которое соответствует хаотическому, но фиксированному расположению хромофоров ([40] и приведенные там ссылки).

Как упоминалось выше, спектры флуоресценции указывают на локализацию индольных флуорофоров с области быстро релаксирующих молекул воды; Dns-метка также находится на поверхности белка. На этом основании мы принимаем движение указанных хромофоров близким к изотропному, т. е. $K^2=2/3$.

С другой стороны, время жизни возбужденного состояния остатка Trp²⁷ падает вследствие переноса энергии ($q/q_0=\tau/\tau_0$, τ и τ_0 — времена жизни возбужденного состояния при наличии миграции энергии и в отсутствие акцептора соответственно) до 0,2 нс для Dns-производного и 0,1 нс для Trp-производного NT-II и становится сопоставимым или даже меньше времени вращательной релаксации индольного кольца и меток (~0,1–0,2 нс). В этом случае хромофоры, имея в основном состоянии произвольную взаимную ориентацию, могут не успевать изменить своего положения за время жизни Trp²⁷ в возбужденном состоянии, что соответствует K^2 , равному 0,476.

Расстояния, вычисленные с учетом вышеуказанных допущений о механизмах тушения остатков Trp и различной относительной ориентации донорно-акцепторных пар, представлены в табл. 4. Расстояния от индольного кольца Trp²⁷ до Dns- либо Trp-метки, которые поочередно присоединены к ε-аминогруппе Lys²⁶, практически совпадают. Близкое значение расстояний между донором и акцептором в случае, когда в качестве акцептора энергии используются различные хромофорные группы, является критерием того, что сделанные при расчетах допущения корректны [41].

Результаты определения относительного расположения индольных колец Trp²⁷ и Trp²⁸ и заместителей в боковых цепях Lys²⁵ и Lys²⁶ суммированы на рис. 8. Найденные расстояния находятся в хорошем соответствии с данными ЯМР для спин-меченных аналогов NT-II [21], согласно кото-

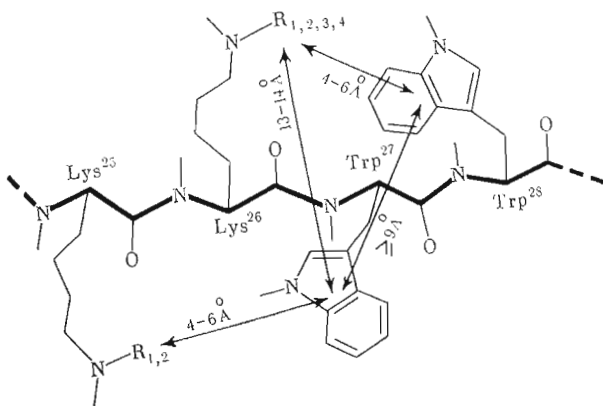


Рис. 8. Схема взаимного расположения боковых цепей фрагмента $\text{Lys}^{25}\text{-Lys-Trp-Trp}^{28}$ в NT-II и его производных. $R_1\text{-SL}$, $R_2\text{-SL}'$, $R_3\text{-Dns}$ и $R_4\text{-Trp}$

рым спиновая метка на Lys^{26} удалена от индольного кольца Trp^{28} не более чем на 0,9 нм и на 1,2 нм от индольного кольца Trp^{27} . Аналогичная ситуация наблюдается, если спиновая метка присоединена к Lys^{25} , однако величины 0,9 и 1,2 нм относятся к Trp^{27} и Trp^{28} соответственно. Приведенные расстояния между боковыми цепями фрагмента полипептидной цепи $\text{Lys}^{25}\text{-Trp}^{28}$ согласуются с β -структурной конформацией центральной петли коротких токсинов [31, 42], частью которой является рассмотренный фрагмент. Кроме того, близкое соседство Trp^{28} и Lys^{26} позволяет утверждать, что боковая цепь инвариантного остатка Trp^{28} непосредственно контактирует с ацетилхолиновым рецептором, как это установлено для боковой цепи Lys^{26} [16].

Авторы выражают благодарность А. Н. Суровой и О. Ф. Борисовой за помощь при измерении времени жизни флуоресценции и Л. Б. Сеявиной за помощь при измерении спектров кругового дихроизма. Авторы признательны чл.-кор. АН СССР В. Т. Иванову за внимание к данной работе и ценные советы при обсуждении ее результатов.

Экспериментальная часть

Синтез производных NT-II описан в работах [16, 21, 43, 44]. Все спектральные измерения проводились при 20°C . Спектры поглощения снимали на спектрофотометре «Beckman Acta M-VI» (США). Спектры КД получены на дихрографе «Jobin Yvon III» (Франция). Корректированные спектры флуоресценции получены на двухлучевом спектрофлуориметре «Aminco SPF-1000» (США). Квантовые выходы определяли как описано в работе [45]. При определении квантовых выходов флуоресценции остатков Trp- и Dns-метки в дансильрованных препаратах нейротоксина в качестве стандартов использовали соответственно раствор Trp в воде ($q = 0,20 \pm 0,01$ [15]) и хининсульфата в 0,1 н. H_2SO_4 ($q = 0,55 \pm 0,05$ [46]).

Дифференциальное флуоресцентное pH-титрование проводилось по схеме, описанной в работе [14]. Константы тушения флуоресценции (K_{sv}) находили по уравнению Штерна — Фольмера

$$F_0/F - 1 = K_{sv}[Q],$$

где F_0 и F — начальная интенсивность флуоресценции и после добавления тушителя в концентрации $[Q]$.

Времена жизни флуоресценции (τ) измеряли на фазовом флуориметре, описанном в [47].

Времена вращательной релаксации (ρ) молекул нейротоксина в рас-

творе находили из уравнения [30]:

$$(1/P-1/3) = (1/P_0-1/3) (1+3\tau/\rho),$$

где P и P_0 — степень поляризации флуоресценции и ее предельное значение.

Время вращательной релаксации для сферических молекул оценивали, используя уравнение Стокса — Эйнштейна,

$$\rho = \rho_0 = 3V_0\eta/RT,$$

где V — объем сферы, η — вязкость раствора, R — универсальная газовая постоянная, T — температура в абсолютной шкале.

Степень поляризации флуоресценции рассчитывали по формуле

$$P = (F_{\parallel} - F_{\perp}) / (F_{\parallel} + F_{\perp}),$$

где F_{\parallel} и F_{\perp} — интенсивности флуоресценции при параллельном и скрещенном расположении поляризатора эмиссии флуоресценции относительно поляризации возбуждающего света. Для того чтобы исключить влияние поляризации излучения образца на пропускание монохроматора эмиссии и чувствительность фотомножителя, между поляризатором эмиссии и монохроматором устанавливали деполаризатор.

Для нахождения ρ строили графики зависимости $1/P$ от T/η (рис. 4б) и от F/F_0 (рис. 4а), поскольку $T/\eta \sim 1/\rho$ и $F/F_0 \sim \tau$.

Величину F находили непосредственно из поляризационных измерений как сумму $F_{\parallel} + 2F_{\perp}$.

Вязкость раствора белка увеличивали добавлением 70% раствора сахарозы в воде (сахароза х.ч.), а тушение флуоресценции осуществляли 3 М раствором KI (х.ч.).

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

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

а также по увеличению квантового выхода акцептора (для Dns-меченых аналогов NT-II):

$$E = (q_{\text{Dns}}^{295}/q_{\text{Dns}}^{330} - f_{\text{Dns}}) \cdot 1/f_{\text{Trp}},$$

где q_0 и q — квантовые выходы флуоресценции триптофанилов в нативном токсине и Dns- и Trp-производных; q_{Dns}^{295} и q_{Dns}^{330} — квантовые выходы флуоресценции Dns-группы при возбуждении на 295 и 330 нм; f_{Dns} и f_{Trp} — вклад дансильного и индолного хромофоров в общее поглощение модифицированного белка при 295 нм. Величина молярного коэффициента экстинкции Trp-группы взята из работы [48].

ЛИТЕРАТУРА

1. Heidmann T., Changeux J.-P. (1978) *Ann. Rev. Biochem.*, **47**, 317–358.
2. Karlsson E. (1978) in: *Handbook of Experimental Pharmacology* (Lee C. Y., ed.), vol. 52, pp. 159–212, Springer Verlag, Berlin.
3. Yang C. C. (1974) *Toxicon*, **12**, 1–43.
4. Бурштейн Э. А. (1976) Люминесценция белковых хромофоров, Изд. ВИНТИ, сер. «Биофизика», т. 6.
5. Бурштейн Э. А. (1976) Собственная люминесценция белка, Изд. ВИНТИ, сер. «Биофизика», т. 7.
6. Seto A., Sato S., Tamiya N. (1970) *Biochim. et biophys. acta*, **214**, 483–489.
7. Menez A., Bouet F., Tamiya N., Framageot P. (1976) *Biochim. et biophys. acta*, **453**, 121–132.
8. Hanert J., Maire M., Sussmann A., Bargetzi J. P. (1979) *Int. J. Peptide Protein Res.*, **6**, 201–222.
9. Chicheportiche R., Rahat C., Sampieri F., Lazdunski M. (1972) *Biochemistry*, **11**, 1681–1691.

10. Bukolova-Orlova T. G., Burstein E. A., Yukelson L. Yu. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **342**, 275–280.
11. Bukolova-Orlova T. G., Permyakov E. A., Burstein E. A., Yukelson L. Yu. (1976) *Biochim. et biophys. acta*, **439**, 426–431.
12. Grishin E. V., Sukhikh A. P., Lukyanchuk N. N., Lipkin V. B., Ovchinnikov Yu. A., Sorokin V. M. (1973) *FEBS Lett.*, **36**, 77–78.
13. 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.
14. Арсеньев А. С., Сури́н А. М., Уткин Ю. Н., Цетлин В. И., Быстров В. Ф., Иванов В. Т., Овчинников Ю. А. (1978) *Биоорг. химия*, **4**, 197–207.
15. Teale F. W. J., Weber G. (1957) *Biochem. J.*, **65**, 476–482.
16. 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. (1979) *FEBS Lett.*, **106**, 47–52.
17. 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.
18. Tsetlin V. I., Arseniev A. S., Utkin Yu. N., Gurevich A. Z., Senyavina L. B., Bystrov V. F., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. (1979) *Eur. J. Biochem.*, **94**, 337–346.
19. Green J. A., Singler L. A., Parks J. H. (1973) *J. Chem. Phys.*, **58**, 2690–2695.
20. London E., Feigenson G. W. (1978) *FEBS Lett.*, **96**, 51–54.
21. 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. (1980) *Proceedings of the 6th International symp. on animal, plant and microbial toxins*, Uppsala, 1979, 523–530.
22. Shinitzky M., Goldman R. (1967) *Eur. J. Biochem.*, **3**, 139–144.
23. Weber G., Shinitzky M. (1970) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **65**, 823–830.
24. Weber G. (1960) *Biochem. J.*, **75**, 335–345.
25. Weber G. (1960) *Biochem. J.*, **75**, 345–352.
26. Teale F. W. J., Badlley R. A. (1970) *Biochem. J.*, **116**, 341–348.
27. Cohn E. J., Edsall J. T. (1943) *Proteins, Amino Acids and Peptides*, Reinhold Publishing Corporation, N. Y.
28. Kuntz I. D., Kauzmann W. (1974) in: *Advances in Protein Chem.*, **28**, 239–345.
29. Tao T. (1969) *Biopolymers*, **8**, 609–632.
30. Weber G. (1953) in: *Advances in Protein Chem.*, **8**, 415–459.
31. 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.
32. Левшин В. Л. (1951) *Фотолюминесценция жидких и твердых веществ*, М.—Л., ГТИ.
33. Eizinger J., Fener B., Lamola A. A. (1969) *Biochemistry*, **8**, 3908–3915.
34. Eizinger J. (1969) *Biochemistry*, **8**, 3902–3907.
35. Chen R. F. (1967) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **120**, 609–620.
36. Shiller P. W. (1975) in: *Biochemical Fluorescence: Concepts* (Chen R., Edelhoch H., eds), pp. 285–303, Marcel Dekker Inc., N. Y.
37. Dexter D. L. (1953) *J. Chem. Phys.*, **21**, 835–850.
38. Conrad R. H., Brand L. (1968) *Biochemistry*, **7**, 777–787.
39. Förster T. (1966) in: *Modern Quantum Chemistry* (Sinanoglu O., ed.), Section IIIB, pp. 93–137, Acad. Press, N. Y.
40. Steinberg I. Z. (1971) *Ann. Rev. Biochem.*, **40**, 83–114.
41. Stryer L. (1978) *Ann. Rev. Biochem.*, **47**, 819–846.
42. Tsernoglou D., Petsco G. (1976) *FEBS Lett.*, **68**, 1–4.
43. Tsetlin V. I., Surin A. M., Utkin Yu. N., Arseniev A. S., Ivanov V. T. (1976) *Abstracts of symposium on peptides and proteins chemistry USSR—FRG*, p. 92.
44. 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. (1979) *Toxicol.* **17** (Suppl. 1), p. 77.
45. Parker C. A., Rees W. T. (1960) *Analyst.*, **85**, 587–601.
46. Melhuish W. H. (1961) *J. Phys. Chem.*, **65**, 229–235.
47. Борисов А. Ю., Тумерман Л. А. (1959) *Изв. АН СССР. Сер. физ.*, **23**, 97–101.
48. Chang C. C., Jang C. C., Nakaji K., Hayashi K. (1971) *Biochim. et biophys. acta*, **251**, 334–344.

Поступила в редакцию
14.VII.1980

FLUORESCENCE STUDIES OF NEUROTOXIN II FROM THE VENOM OF COBRA
Naja naja oxiana AND ITS DERIVATIVES: CONFORMATION OF THE
FRAGMENT-Lys²⁵-Lys²⁶-Trp²⁷-Trp²⁸-

SURIN A. M., UTKIN Yu. N., PLUZHNIKOV K. A.,
EFREMOV E. S., TSETLIN V. I.

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

Neurotoxin II (NT-II) from the venom of Middle-Asian cobra *Naja naja oxiana* and a series of its derivatives selectively modified at lysine residues have been studied by various fluorescence techniques. It was found that the two tryptophan residues of NT-II (Trp²⁷-Trp²⁸) give identical fluorescence spectra ($\lambda_{\max}=340$ nm), and also have very close quantum yields and fluorescence life-times. Fluorescence polarization studies of the NT-II and its dansylated derivative [Lys²⁶(Dns)]NT-II revealed that the shape of the toxin molecules in solution deviates considerably from the rigid sphere model. The pH-dependence of emission of NT-II and a series of its monoacetylated and monospin-labeled derivatives was investigated. The distance between the Trp²⁸ indole ring and the spin label at Lys²⁶ residue was determined as 0,4–0,6 nm, the same distance found between the Trp²⁷ side-chain and the spin label attached to Lys²⁵. The indole rings of Trp²⁷ and Trp²⁸ are separated by not less than 0,9 nm. The dansyl or trinitrophenyl chromophores bound to the Lys²⁶ amino group are situated at 1,3–1,4 nm from the Trp²⁷ indole ring and at 1 nm or closer to the Trp²⁸ ring, as follows from the energy transfer measurements. The side chain distances between the neighbouring tryptophanyl and lysyl residues agree with the β -structure for the polypeptide backbone of the central loop in the neurotoxin molecule containing the fragment -Lys²⁵-Lys²⁶-Trp²⁷-Trp²⁸.