



УДК 577.112.5 : 595.44-114.52.088

© 1991 г.

Т. М. Волкова, Т. Г. Галкина, А. Б. Буделин,
Е. В. Гришин

СТРУКТУРА ТРИПТИЧЕСКИХ ФРАГМЕНТОВ НЕЙРОТОКСИНА ИЗ ЯДА ПАУКА КАРАКУРТА

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва

Определена N-концевая аминокислотная последовательность нейротоксина из яда паука *Latrodectus mactans tredecimguttatus* (α -латротоксина). Осуществлен триптический гидролиз карбоксиметил-производного латротоксина, в результате определена полная или частичная последовательность 25 фрагментов, содержащих в сумме 252 аминокислотных остатка. Получена структурная информация, необходимая для клонирования структурного гена латротоксина.

Нейротоксин из яда паука каракурта *Latrodectus mactans tredecimguttatus* селективно взаимодействует с рецептором пресинаптической мембраны, вызывая усиление процесса секреции нейромедиатора в нервных окончаниях позвоночных животных [1—3]. При встраивании в бислоиные липидные мембраны нейротоксин каракурта (α -латротоксин) способен образовывать катион-селективные ионные каналы [4]. Кроме того, токсин обладает фузогенными свойствами [5].

α -Латротоксин представляет собой белок молекулярной массы около 120 кДа с изоэлектрической точкой $\sim 5,2$ [6]. Предполагается, что его молекула содержит по крайней мере два функциональных фрагмента, один из которых участвует в связывании с рецептором, а другой обуславливает каналоформерные свойства токсина. Для дальнейшего исследования молекулярного механизма действия α -латротоксина необходимым условием является его структурный анализ. Данная работа посвящена определению аминокислотной последовательности триптических фрагментов молекулы токсина с целью получения необходимой информации для синтеза олигонуклеотидных зондов и для подтверждения структуры соответствующих клонов кДНК.

Выделение α -латротоксина из цельного яда паука *Latrodectus mactans tredecimguttatus* проводилось по методу, описанному ранее [6]. Полученный препарат, по данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, представлял собой белок с молекулярной массой около 120 кДа (рис. 1). При внутривенном введении мышам было показано, что LD_{50} токсина составляет 46 мкг/кг. Выделенный белок, по данным твердофазного иммуноферментного анализа [7], специфично взаимодействует с моноклональными антителами к ранее полученному образцу α -латротоксина [8].

При определении N-концевого аминокислотного остатка оказалось, что в свежевыделенном препарате белка идентифицируется только глутаминовая кислота. Однако в ряде экспериментов наряду с глутаминовой кислотой был обнаружен изолейцин. По-видимому, этот факт может быть обусловлен нестабильностью молекулы нейротоксина в процессе хранения и подготовки анализируемого препарата.

Для определения N-концевой последовательности α -латротоксина предварительно был проведен электрофорез в ПААГ в присутствии SDS 100 пмоль препарата токсина и затем электроперенос белковой зоны с молекулярной массой 120 кДа на поливинилпирролидон (иммобилон).

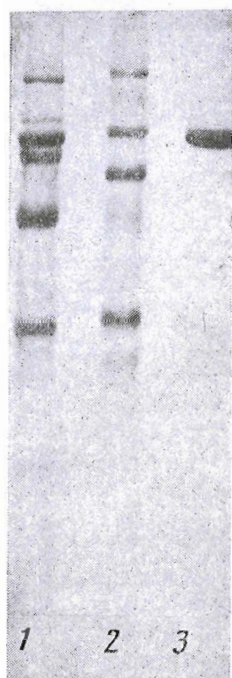
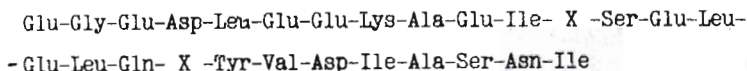


Рис. 1. Электрофоретический анализ в 10% ПААГ в присутствии SDS: 1 — целый яд *L. m. tredecimguttatus*; 2 — маркерные белки, сверху вниз (M , кДа): мкозин (200), β -галактозидаза (116), фосфорилаза В (93), бычий сывороточный альбумин (67), овальбумин (43); 3 — α -латротоксин

После этого проводилось автоматическое секвенирование иммобилизованного белка, в процессе которого удалось определить последовательность 30 аминокислотных остатков:



С целью получения дополнительной информации о структуре молекулы токсина было предпринято изучение продуктов его триптического гидролиза. По данным аминокислотного анализа, молекула латротоксина содержит приблизительно 74 остатка лизина и 35 остатков аргинина, поэтому ожидалось образование более 100 небольших (в среднем по 10—20 аминокислотных остатков) пептидных фрагментов.

Поскольку α -латротоксин содержит около 10 остатков цистеина и при этом не имеет свободных сульфгидрильных групп [6], перед проведением ферментативного расщепления белка осуществлялась обработка препарата токсина дитиотреитом в присутствии 6 М мочевины с последующим карбоксиметилированием иодуксусной кислотой. Модифицированный белок гидролизовали трипсином в течение 18 ч. После лиофилизации гидролизат растворяли в 0,1% трифторуксусной кислоте. Растворимые в данных условиях пептиды фракционировали ВЭЖХ с обращенной фазой на колонке Ultrasphere ODS C_{18} , в процессе которой было получено более 130 фракций (рис. 2).

Анализ N-концевых аминокислотных остатков ряда фракций показал, что все они нуждаются в дополнительной очистке. Рехроматография пептидных фракций проводилась ВЭЖХ с обращенной фазой при pH 5,7 в 10 мМ ацетате аммония. Таким образом было выделено более 30 гомогенных триптических фрагментов α -латротоксина. Для всех этих пептидов определен аминокислотный состав, для ряда из них установлена структура. Анализ аминокислотных последовательностей фрагментов показал, что они не имеют достаточно высокого структурного сходства (не более 20—25%) ни с одним из известных белков. В целом в процессе исследования триптических пептидов нейротоксина каракурта определена полная или частичная аминокислотная последовательность 25 фрагментов (рис. 3), содержащих в сумме 252 аминокислотных остатка. Результаты

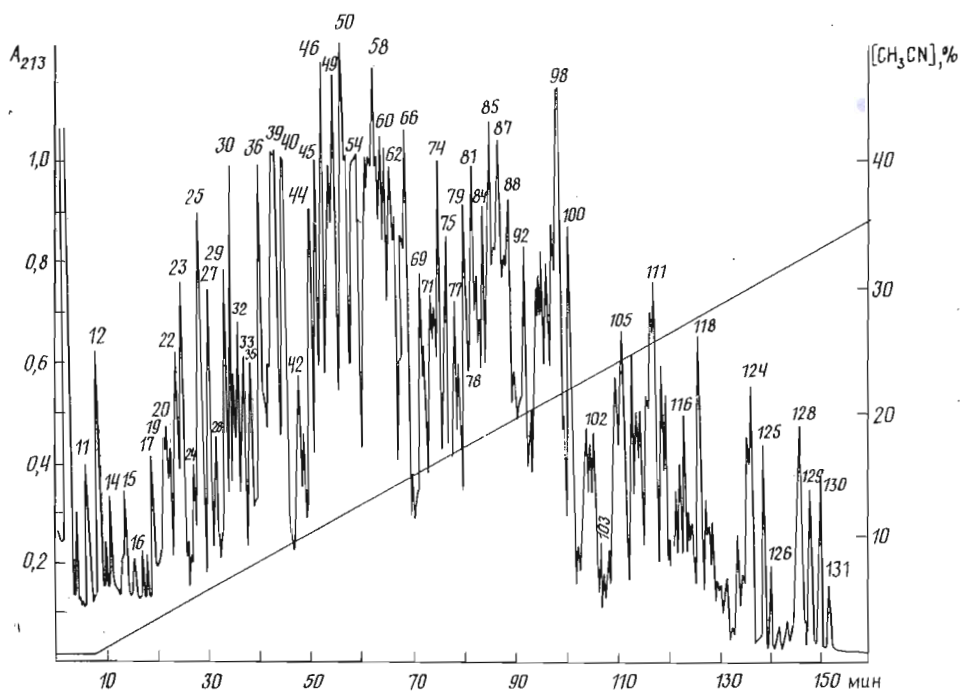


Рис. 2. Фракционирование триптического гидролизата α -латротоксина методом ВЭЖХ с обращенной фазой на колонке (4,6 \times 250 мм) Ultrasphere ODS C_{18} в 0,1% трифторуксусной кислоте в градиенте концентрации ацетонитрила. Скорость элюции 1 мл/мин

36-2	Ser-Thr-Glu-Leu-Asn-Gln-Pro-Asp-Lys
45-1	Ile-Asp-Gln-Gly-Ser-Asn-Phe-Glu-Ala-Lys
49-3	Phe-Asn-Glu-Ile-Asp-Arg-Lys
50-4	Gly-Tyr-Leu-Glu-Thr-Thr-Lys
51-5	Tyr-Phe-Asp-Thr-Glu-Lys-Glu-Arg
51-7	Tyr-Ala-Val-Gln-Tyr-Ala-Ser-Glu-
55-2	Asn-His-Leu-Gln-Val-
59-2	Val-Asn-His-Asp- X -Gly-Asn-Gly-Met-Thr-Ala-Ile-Asp-Lys
61-3	Lys-Gly-Asn-Leu-Asp-Met-Val-Lys
62-1	Phe-Asp-Glu-Val-Met-Lys
65-1	Glu-Gly-Glu-Asp-Leu-Thr-Leu-Glu-Glu-
73-1	Ala-Glu-Ile- X -Ser-Glu-Leu-
82-4	Tyr-Gly-His-Leu-Asp-Ile-Val-Lys
82-2-1	Leu-Asp-Ser-His-Ser-Ala-Ala-Leu-Glu-Glu-Ile-Thr-Lys
82-2-2	Met-Thr-Leu-Ser-Glu-Thr-Pro-Glu-Asn-Phe-Ala-Gln-
85-1	Ser-Ser-Leu-Val-Gly-Thr-Gly-Thr-Ser-Asn-Asn-Glu-Gly- -Leu-Leu-Asp-Arg
85-2	Tyr-Phe-Ile-Asp-Gln-Gly-Ala-Asp-Ile-Asn-Thr-
87-1	Leu-Met-Glu-Ser-Pro-Glu-Ile-Asn-Ile-Asn-Glu-Arg
97-6	Phe-Leu-Ala-Ala-Asn-Gly-Val-Asp-Phe-Arg
102-4	Lys-Phe-Asp-Ser-Ser-Lys-Pro-Gln-Leu-Val-Gly-Glu-Ile- -Thr-Pro-Tyr-
106-1	Asn-Ser-Glu-Phe-Leu-Gly-Leu-Glu-Lys
108-5	Phe-Ser-Asn-Ile-Val-Glu-Tyr-Leu-
109-2	Leu-Glu-Glu-Pro-
125-1	Thr-Pro-Thr-Asp-Asp-Ser-Leu-Gln-Ala-Pro-Pro-Phe-Ser-Ile - X -Glu-
130-1	Leu-Asp-Ile-Glu-Gln-Thr-Leu-Leu-Gly- X -Ser-Asp-Leu- -Pro-Phe-Asp-Gln-Ile-

Рис. 3. Аминокислотные последовательности триптических фрагментов α -латротоксина. Первая цифра соответствует номеру фракции (рис. 2), из которой выделен пептид, последующие цифры — номера фракций рехроматографических очисток

определения N-концевой аминокислотной последовательности α -латротоксина и структурного анализа триптических пептидов являются основой для дальнейшей работы по клонированию его структурного гена.

Авторы выражают глубокую благодарность И. В. Назимову и В. В. Шемякину за автоматическое секвенирование пептидов.

Экспериментальная часть

Лиофилизированный цельный яд каракурта *L. m. tredecimguttatus* получали из Казахского зоокомбината.

α -Латротоксин из 500 мг цельного яда *L. m. tredecimguttatus* выделяли как описано ранее [6]. Белковый состав фракций, полученных в процессе выделения, контролировали с помощью электрофореза в ПААГ в присутствии SDS по методу Лэммли [9].

N-Концевые аминокислотные остатки латротоксина и его фрагментов определяли в виде Dns-производных [10].

Биологическую активность определяли при внутривенном введении мышам, LD₅₀ рассчитывали по методу Литчфильда и Уилкоксона [11].

Аминокислотный состав латротоксина определяли на аминокислотном анализаторе модели D-500 (Durrum, США) после 24, 48 и 72-часового гидролиза в 6 н. HCl (Pierce, США). Аминокислотный состав триптических фрагментов определяли после гидролиза в газовой фазе 6 н. HCl, содержащей 0,1% фенола на приборе системы Pico-tag (Waters, США).

Карбоксиметилирование латротоксина. α -Латротоксин (5 мг, ~40 нмоль) концентрировали до 5 мл и диализовали против 50 мМ трис-HCl (pH 8,2), затем добавляли мочевины до концентрации 6 М, EDTA — до 2 мМ и 20 мкмоль дитиотрепта, восстановление проводили в течение 5 ч при 20° С. Затем добавляли 40 мкмоль иодуксусной кислоты, растворенной в 0,5 н. NaOH. Через 15 мин карбоксиметил-латротоксин (CM-латротоксин) обессоливали на колонке (1,5 × 38 см) с сефадексом G-25m, уравновешенным 0,1 М NH₄HCO₃ (pH 8) при скорости элюции 60 мл/ч.

Триптический гидролиз CM-латротоксина. К CM-латротоксину, растворенному в 9 мл 0,1 М NH₄HCO₃ (pH 8), добавляли TPCK-трипсин (Serva, ФРГ) в соотношении 1 : 100 (по весу), расщепление осуществляли при 37° С в течение 18 ч. Через 6 ч после начала гидролиза еще раз добавляли трипсин (1 : 100). По окончании реакции гидролизат дважды лиофилизовали.

Фракционирование пептидов. Гидролизат растворяли в 1,4 мл 0,1% трифторуксусной кислоты. Супернатант фракционировали с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой на колонке Ultrasphere ODS C₁₈ (5 мкм, 4,6 × 250 мм; Beckman, США) в 0,1% трифторуксусной кислоте в градиенте концентрации ацетонитрила. Разделение пептидов проводили на жидкостном хроматографе Du Pont (США). Пептидные фракции отбирали на основании показаний проточного спектрофотометра при длине волны 213 нм. Рехроматографию отдельных фракций осуществляли ВЭЖХ с обращенной фазой на колонке (4,6 × 250 мм) Nucleosil ODS в 10 мМ NH₄HCO₃ (pH 5,7) в градиенте концентрации ацетонитрила.

Электрофорез латротоксина проводили по методу [9], затем осуществляли электроперенос белковой зоны на поливинилидендифторид (иммобилон TM; Millipore, США) на приборе Midget Multiblott Electrophoretic Unit 2021 (LKB, Швеция) в 10 мМ Na-боратном буфере (pH 9,5), содержащем 0,005% SDS, в течение ночи при силе тока 250 мА [12]. Белковые зоны окрашивали 0,1% кумасси R-250 в 50% метаноле.

Аминокислотную последовательность триптических пептидов, а также *N*-концевую последовательность α -латротоксина, иммобилизованного на иммобилоне, устанавливали с помощью автоматической деградации в газофазном секвенаторе 470A (Applied Biosystems, США) с идентификацией фенилтиогидантоиновых производных аминокислот.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Frontali N., Cecarelli B., Gorio A., Mauro A., Stekevitz P., Harlbut W. P. // J. Cell Biol. 1976. V. 68. N 2. P. 462—479.
2. Grasso A. // Biochim. et biophys. acta. 1976. V. 349. N 2. P. 406—412.
3. Nicholls D. G., Rugolo M., Scott I. G., Meldolesi J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. N 24. P. 7924—7928.
4. Grasso A. // Neurotoxins in Neurochemistry / Ed. Dolly J. O. N. Y. — Chichester — Toronto: Ellis Horwood Limited Publ., 1988. P. 67—78.
5. Sokolov I. V., Chanturia A. N., Lishko V. K. // Biochim. et biophys. acta. 1987. V. 900. N 2. P. 295—299.

6. Ушкарев Ю. А., Гришин Е. В. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 1. С. 71—80.
7. Engvall E. // Meth. Enzymol. 1980. V. 70. P. 419—439.
8. Пашков В. Н., Ковалевская Г. И., Красноперов В. Г., Булгаков О. В. // Биоорг. химия. 1989. Т. 15. № 9. С. 1281—1283.
9. Laemmli W. N. // Nature (London). 1970. V. 227. N 5559. P. 680—685.
10. Levina N. B., Nazimov I. V. // J. Chromatogr. 1984. V. 286. N 1. P. 207—216.
11. Белецкий Л. М. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Гос. изд-во мед. литературы, 1963. С. 81.
12. Левина Н. В., Слепак В. Э., Киселев О. Г., Шемякин В. В., Хохлачев А. А. // Биоорг. химия. 1989. Т. 15. № 1. С. 24—31.

Поступила в редакцию
2.VII.1990

Т. М. VOLKOVA, Т. Г. GALKINA, А. В. KUDELIN, Е. В. GRISHIN
TRYPTIC FRAGMENTS STRUCTURE OF THE BLACK WIDOW
SPIDER VENOM NEUROTOXIN

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

The N-terminal amino acid sequence of a neurotoxin from the venom of *Latrodectus mactans tredecimguttatus* (α -latrotoxin) was determined. Latrotoxin was subjected to the tryptic cleavage and total or partial amino acid sequences of 25 peptides were established. In total the tryptic fragments contained 252 amino acid residues. Essential structural information on cloning of the latrotoxin structural gene was obtained.