



УДК 591.145.2-544 : 537.533.37

© 1991 г.

А. В. Лунев, В. В. Демин, О. Н. Зайцев,
С. Н. Спадар, Е. В. Гришин

ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ α -ЛАТРОТОКСИНА ИЗ ЯДА
ПАУКА КАРАКУРТА *LATRODECTUS MACTANS*
TREDECIMGUTTATUS

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

Методами электронной микроскопии исследована структура двумерных кристаллов α -латротоксина из яда паука каракурта *Latrodectus mactans tredecimguttatus*. Кристаллы получены адсорбцией белка из раствора с высоким содержанием ионов Mg^{2+} на электронно-микроскопическую сеточку, покрытую углеродной пленкой. Эти кристаллы имели размеры до 0,4 мкм и давали отчетливую оптическую дифракцию, что позволило провести Фурье-фильтрацию изображений на ЭВМ. Получена карта распределения контрастирующего вещества в двумерном кристалле с разрешением 4 нм. Установлена принадлежность кристаллов к двусторонней плоской группе симметрии $p4$. Параметры элементарной ячейки составляют: $a = b = 15,55$ нм, $\gamma = 90^\circ$.

Расчет молекулярной массы белковой части элементарной ячейки кристаллов с учетом оси симметрии четвертого порядка показал, что частицы латротоксина, наблюдаемые при негативном контрастировании, состоят из 4 или 8 протомеров.

Одним из наиболее эффективных подходов к выяснению молекулярных механизмов передачи нервного возбуждения является использование природных «инструментов» — молекул, специфически влияющих на процессы, происходящие в синапсах или мембране нервного волокна. К таким соединениям следует отнести и α -латротоксин — основной токсический компонент яда паука каракурта (*Latrodectus mactans tredecimguttatus*), вызывающий массивный выброс медиатора из пресинаптического окончания нервного волокна. Токсины из яда пауков рода *Latrodectus* представляют особый интерес, так как они взаимодействуют непосредственно с компонентами пресинаптических мембран и не обладают при этом ни фосфолипазной активностью (в отличие от β -бунгаротоксина, тайпоксина, кротоксина и других нейротоксинов ядов змей), ни способностью проходить сквозь пресинаптическую мембрану внутрь нервного окончания (что присуще ботулиническому и столбнячному токсинам) [1—3].

Установлено, что этот токсин действует практически на все типы синапсов и, по-видимому, влияет на какие-то ключевые стадии секреции нейромедиатора, общие для всех типов синапсов. Биологическая активность α -латротоксина реализуется после его взаимодействия (связывания) со специфическим рецептором пресинаптической мембраны и проявляется в резком усилении секреции медиатора [4]. Важно отметить, что α -латротоксину свойственна также и «каналообразующая» активность: способность избирательно увеличивать Ca^{2+} -проницаемость плоских липидных мембран и липосом [5, 6].

Выяснение молекулярного механизма функционирования биологически активного соединения невозможно без знания его химической природы и всех уровней его структурной организации. Установлено, что α -латротоксин — белок, состоящий из идентичных негликозилированных субъединиц, причём в состав каждой субъединицы входит 1041 аминокислотный остаток [7, 8]. Для данного белка характерна значительная внутримолекулярная структурная гомология, связанная с наличием около 20 повторяющихся пептидных фрагментов. Предполагается, что ряд этих фрагментов входит в состав функционального домена токсина [8].

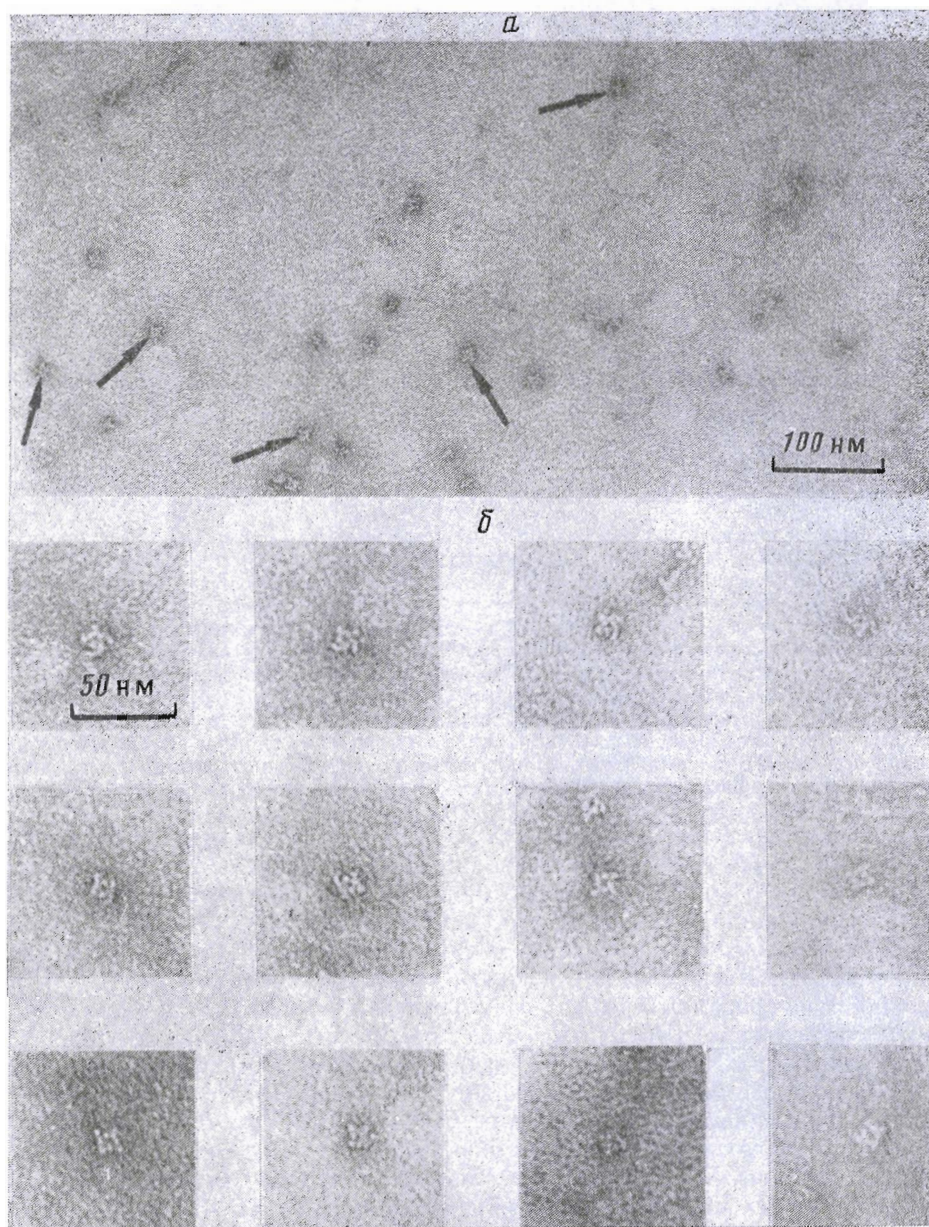


Рис. 1. Микрофотографии α -латротоксина, негативно-контрастированного 2% водным раствором уранилацетата: а — общий вид, б — изображения отдельных частиц

Данная работа посвящена изучению α -латротоксина методами электронной микроскопии и является первым шагом в исследовании его пространственной структуры. Полученные в работе двумерные кристаллы не только открывают перспективы для построения в ближайшее время трехмерной модели молекулы с низким разрешением [9], но и позволят значительно сузить диапазон условий для получения трехмерных кристаллов.

При негативном контрастировании гомогенного препарата α -латротоксин выявляется в виде частиц, имеющих размеры в пределах 10—15 нм (рис. 1).

При сохранении ряда общих черт частицы могут довольно значительно отличаться друг от друга, что свидетельствует о большой вариабельности ориентаций частиц токсина на пленке-подложке. Это затрудняет применение методов обработки одиночных изображений молекул в данном случае

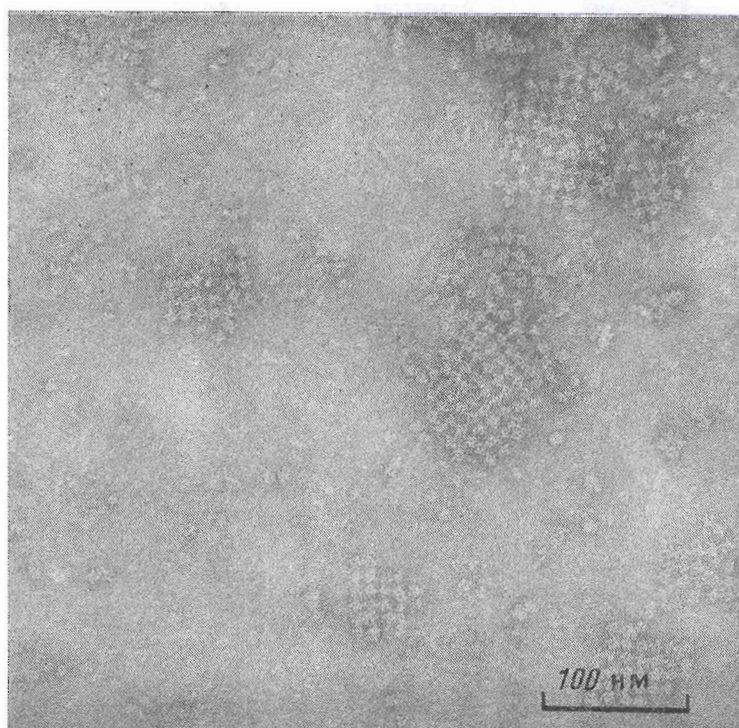


Рис. 2. Микрофотографии двумерных кристаллов α -латротоксина, негативно-контрастированных 2% водным раствором уранилацетата

так как для получения набора статистически достоверных проекций молекулы, соответствующих различным ориентациям частиц на пленке-подложке, потребовалось бы обработать большое количество изображений [10]. С другой стороны, цифровая обработка электронно-микроскопических изображений упорядоченных образований этого белка могла бы существенно сократить время, необходимое для получения трехмерной структуры [9, 11].

Как правило, частицы α -латротоксина равномерно распределялись по подложке и адсорбировались на нее в произвольных ориентациях. Однако при высокой концентрации ионов Mg^{2+} (0,5 М) и в узком диапазоне рН (8,2—8,5) латротоксин агрегировал в двумерные кристаллы, что наблюдалось при негативном контрастировании таких препаратов (рис. 2).

Кристаллы имели размеры до 0,4 мкм, изображения некоторых из них давали отчетливую оптическую дифракцию, что позволило провести Фурье-фильтрацию изображений на ЭВМ с применением кристаллографических программ [11]. На рис. 3а представлена карта распределения контрастирующего вещества в элементарной ячейке кристалла после Фурье-фильтрации с разрешением 4 нм. Параметры ячейки $a = b = 15,55$ нм, $\gamma = 90^\circ$, соотношения между амплитудами и фазами рефлексов, а также высокие коэффициенты кросс-корреляции изображения самого с собой при его вращении на 90 , 180 и 270° (рис. 3б) позволяют заключить, что кристаллы принадлежат к двусторонней плоской группе симметрии $p4$ [12]. С учетом симметрии было рассчитано распределение контрастирующего вещества в кристалле, контурная карта которого приведена на рис. 4.

Полученная проекция белковой части элементарной ячейки α -латротоксина имеет вид квадрата со стороной около 11 нм, который имеет в центре минимум 2,5 нм в диаметре и восемь (четыре больших и четыре малых) максимумов белковой плотности. Наличие оси симметрии четвертого порядка указывает на то, что элементарная ячейка кристалла состоит из четырех одинаковых частей (4, 8, 12... полипептидных цепей). Молекулярная масса протомера, по данным электрофореза и пептидного

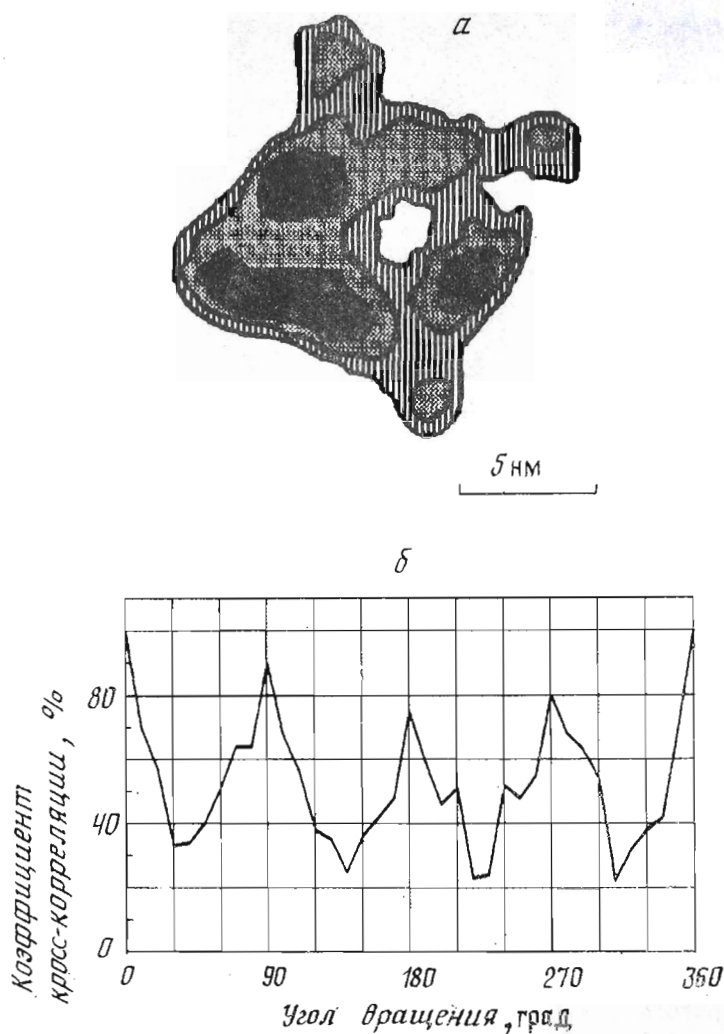


Рис. 3. *a* — фильтрованное изображение элементарной ячейки кристалла α -латротоксина; более темные участки изображения соответствуют меньшей плотности контрастирующего вещества; *b* — кривая коэффициентов кросс-корреляции представленного изображения самого с собой при его вращении от 0 до 360°

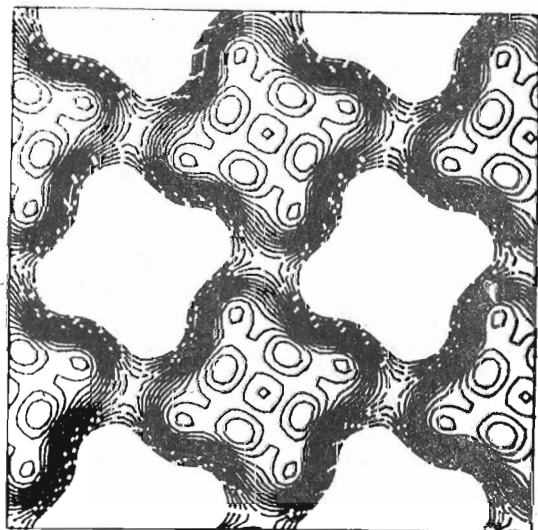


Рис. 4. Контурная карта двумерного кристалла α -латротоксина, рассчитанная с учетом группы симметрии $p4$ (4 элементарные ячейки). За нулевой контур принята средняя плотность контрастирующего вещества, при этом сплошные линии соответствуют положительным контурам (меньшей плотности контрастера), а штриховые — отрицательным (представлена только часть отрицательных контуров)

анализа, составляет 130 кДа [7]. Расчет этого параметра на основе структуры полноразмерного гена дает величину 157 кДа [8]. Предполагая, что элементарная ячейка образована четырьмя протомерами с молекулярной массой $130 \times 4 = 520$ или $157 \times 4 = 628$ кДа, а также считая, что ее удельный парциальный объем близок к величине $1,3 \text{ нм}^3/\text{кДа}$ [9], получаем нижнюю оценку для толщины двумерного кристалла — 5,6 и 6,7 нм соответственно. Для восьми полипептидных цепей (1040 или 1256 кДа) этот параметр будет составлять соответственно 11,2 и 13,4 нм. Большое количество протомеров не будет укладываться в данный объем, так как рассчитанные величины являются оценками снизу, а размеры белковых частиц, как следует из рис. 1, не превосходят 15 нм.

Таким образом, полученная информация о симметрии кристаллов α -латротоксина указывает на то, что в состав частиц латротоксина, выявляемых при негативном контрастировании, входят 4 или 8 протомеров. Это не позволяет сделать однозначное заключение о составе функционально активной молекулы токсина. Однако то обстоятельство, что минимальной структурной единицей, выявляемой как для одиночных частиц, так и для двумерных кристаллов, является тетрамер или октамер, говорит о том, что в растворе белок существует в виде олигомеров идентичных полипептидов. Более детальная информация об относительном расположении полипептидов и их пространственной структуре может быть получена после реконструкции трехмерной структуры молекулы по наклонным изображениям данных кристаллов и одиночных частиц [9, 11].

Экспериментальная часть

α -Латротоксин из яда паука каракурта (*Latrodectus mactans tredecimguttatus*) выделяли методом аффинной хроматографии. В качестве аффинного сорбента использовали мышинные моноклональные антитела к α -латротоксину, иммобилизованные на сефарозе 4В [13]. Хроматографию проводили на колонке, уравновешенной 20 мМ трис-НСl-буфером (рН 8,0), содержащим 0,2 М NaCl. Колонку промывали тем же буфером в присутствии 0,5 М NaCl. Нейротоксин элюировали 20 мМ трис-НСl-буфером (рН 8,0), содержащим 0,1 М NaCl и 0,5 М MgCl_2 .

Электрофорез в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия проводили по методу [14]. Полученный белок был электрофоретически гомогенен.

Токсический эффект оценивался на мышах при введении нейротоксина внутривенно. Результаты согласуются с данными [15].

Препараты α -латротоксина наносили на электронно-микроскопические сеточки, покрытые углеродной пленкой-подложкой. Негативное контрастирование препаратов проводили 2% водным раствором уранилацетата. Образцы исследовали в электронном микроскопе JEM-100CX-2 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Выбор электронных микрофотографий для Фурье-фильтрации осуществляли на лазерном дифрактометре [16]. Калибровку увеличения микрофотографий проводили по кристаллам каталазы (Balzers, Лихтенштейн).

Денситометрирование микрофотографий осуществляли на автоматическом микроденситометре AD-1 (Syntex, США). Размеры сканирующей апертуры — 32×32 мкм, площадь сканирования — 256×256 точек, увеличение микрофотографий $\times 42000$.

Изображения обрабатывались на ЭВМ Eclipse C/330 (Data General, США) с использованием комплексов программ, описанных в работах [10, 11].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Scheer H., Madeddu Z., Wanke E., Ferreni A., Meldolesi J. // Regulatory Peptides // Eds Bloom F. E., Hakanson K. Elsevier Sci. Publ., 1985. P. 53—58.
2. Rosenthal L., Meldolesi J. // Pharmac. Ther. 1989. V. 42. P. 115—134.
3. Prespino G., Scheer H., Meldolesi J. // Bioelectrochem. and Bioenergetics. 1987. V. 17. P. 361—368.
4. Meldolesi J., Scheer H., Madeddu L., Wanke E. // Trends Pharm. Sci. 1986. V. 7. P. 151—155.

5. Finkelstein A., Rubin L. L., Tzeng M.-C. // Science. 1976. V. 193. № 4292. P. 1009—1011.
6. Соколов Ю. В., Ушкарев Ю. А., Грассо А., Гришин Е. В., Лишко В. К. // Укр. биохим. журн. 1983. Т. 55. № 2, С. 179—184.
7. Ушкарев Ю. А., Гришин Е. В. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 1. С. 71—80.
8. Kiyatkin N. I., Dulubova I. E., Chekhovskaya I. A., Grishin E. V. // FEBS Lett. 1990. V. 270. № 1. P. 127—131.
9. Unwin P. N. T., Henderson R. // J. Mol. Biol. 1975. V. 94. № 3. P. 425—430.
10. Frank J. // Processing of Electron Microscopic Images. B., N. Y.: Springer-Verlag, 1980. P. 187—222.
11. Amos L. A., Henderson R., Unwin P. N. T. // Prog. Biophys. Molec. Biol. 1982. V. 39. № 2. P. 183—231.
12. Holser W. T. // J. Crystallogr. 1958. V. 110. № 1. P. 266—281.
13. Пашков В. Н., Ковалевская Г. И., Красноперов В. Г., Булажов О. В. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 9. С. 1281—1283.
14. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.
15. Grasso A. // Biochim. et biophys. acta. 1976. V. 439. № 2. P. 406—412.
16. Klug A., Berger J. E. // J. Mol. Biol. 1964. V. 10. № 3. P. 565—569.

Поступила в редакцию
26.XII.1990

A. V. LUNEV, V. V. DEMIN, O. I. ZAITSEV, S. I. SPADAR,
E. V. GRISHIN

ELECTRON MICROSCOPY OF α -LATROTOXIN FROM THE VENOM OF BLACK WIDOW SPIDER *LATRODECTUS MACTANS* *TREDECIMGUTTATUS*

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

Two-dimensional crystals of α -latrotoxin from the venom of black widow spider (*Latrodectus mactans tredecimguttatus*) were studied by the negative staining electron microscopy. Two-dimensional crystals were obtained by adsorption of the protein solution with a high Mg^{2+} concentration on carbon-coated electron microscopy grids. The crystals were about 0.4 μm in size, had the unit cell parameters: $a = b = 15.55$ nm, $\gamma = 90^\circ$, $p4$ plane group symmetry. The contour map of a stain-excluding region of such crystals was calculated by the Fourier-filtering procedure at about 4 nm resolution.

The calculation of molecular weight of the unit cell, with the symmetry $p4$ taken into account, showed that α -latrotoxin particles, revealed by negative staining, consisted of 4 or 8 protomers.