



УДК 591.145.2/577.112.5.(012.62+016)

© 1994 К. А. Плужников, Д. Е. Нольде, С. М. Тertyшникова\*,  
С. В. Суханов, А. Г. Соболев, М. Ю. Торгов, А. К. Филиппов\*,  
А. С. Арсеньев, Е. В. Гришин

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОСНОВНОГО  
ТОКСИЧЕСКОГО КОМПОНЕНТА ЯДА МУРАВЬЯ  
*Ectatomma tuberculatum*

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и  
Ю. А. Овчинникова РАН, Москва;

\* Филиал Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина и  
Ю. А. Овчинникова РАН, Пущино Московской обл.

Ключевые слова: яд муравья; эктатомин; токсины, белки, ЯМР; структуры — первичная, вторичная, пространственная; ионные каналы.

Из яда муравья *Ectatomma tuberculatum* выделен эктатомин — низкомолекулярный белок (7928 Да), отвечающий за основной токсический эффект яда. С помощью методов белковой химии и двумерной ЯМР-спектроскопии установлена его полная аминокислотная последовательность и пространственная структура в водном растворе. Эктатомин состоит из двух высокомолекулярных полипептидных цепей, содержащих соответственно 37 и 34 аминокислотных остатка и соединенных между собой одной дисульфидной связью. Внутри каждой цепи также имеется по одному дисульфидному мостику. Для пространственной структуры эктатомина в водном растворе характерно наличие четырех плотноупакованных амфифильных  $\alpha$ -спиралей. В концентрациях 0,05—0,1 мкМ он формирует катионспецифичные каналы в клеточных и искусственных мембранах с участием двух молекул белка.

Яд жалоносного муравья *E. tuberculatum* — один из наиболее токсичных не только среди ядов различных видов муравьев, он превосходит по токсичности яды одиночных ос и пчел [1]. Летальная доза этого яда ( $LD_{50}$ ) при внутрибрюшинном введении мышам составляет 1,7 мг/кг [2]. Яд также высокотоксичен и для насекомых. По химическому составу яд является достаточно гетерогенной системой с высоким содержанием веществ белковой природы, большинство из которых — ферменты [3].

Настоящая работа посвящена выделению основного токсического компонента этого яда, установлению его первичной и пространственной структуры, а также выяснению его функциональной роли.

Адрес для переписки: 117871, Москва В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Институт биоорганической химии. Плужников К. А.

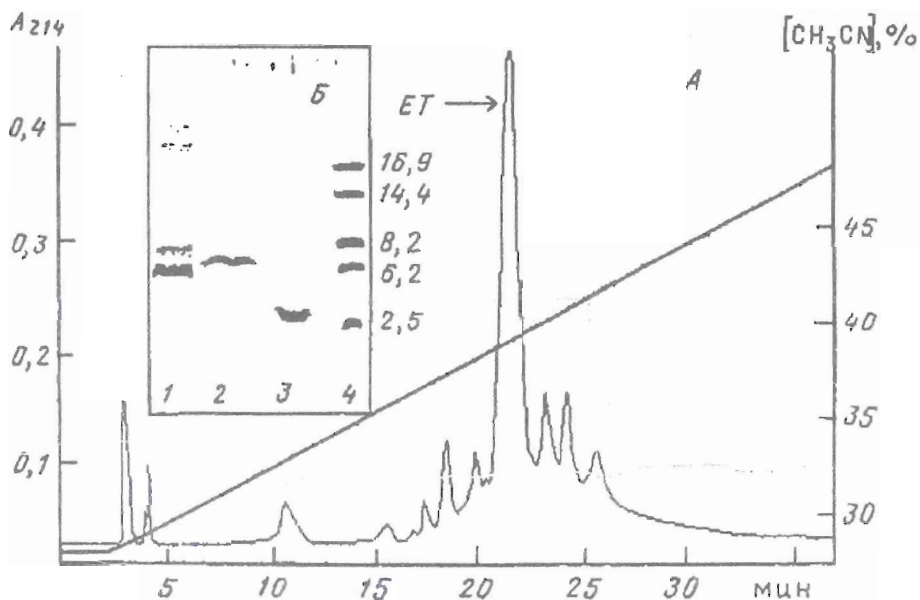


Рис. 1. Обращенно-фазовая хроматография токсической фракции яда муравья *E. tuberculatum* на колонке Ultrapore RPMC, 5 мкм (0,46 × 25 см) в 0,1% трифторуксусной кислоте в градиенте концентрации ацетонитрила при скорости элюции 1 мл/мин (а) и электрофорез в ПААГ (б): цельного яда (1); эктатомина из фракции ET в присутствии SDS (2) и в восстанавливающих условиях (3); 4 — маркерные белки (справа указаны молекулярные массы, кДа)

Выделение токсина проводили в две стадии с использованием на первом этапе гель-проникающей хроматографии на сефадексе G-50f, с последующим разделением фракции, обладающей токсическим эффектом на мышах, методом ВЭЖХ с обращенной фазой (рис. 1а).

Полученный образец отвечал за основной токсический эффект цельного яда в отношении млекопитающих и насекомых и, по данным электрофореза в ПААГ в невосстановленных условиях в присутствии SDS, имел молекулярную массу около 7,5 кДа (рис. 1б). Летальные дозы ( $LD_{50}$ ), определенные для него при внутривенной инъекции в мозг мышам и во второй грудной сегмент тараканам, имели соответственно величины 6,8 мкг/кг и 2,1 мг/кг. В дозах 1,7—2 мг/кг живого веса тараканов этот токсин вызывал быстрое развитие полной парализации, необратимой в течение 5—7 сут. По названию вида муравья, из которого был выделен этот токсический белок, он был назван эктатомином. По нашим оценкам, его содержание в яде составляло 15—18%.

Эктатомин, по данным аминокислотного анализа, является сильно основным белком (14 Lys и 1 Arg) и содержит 6 остатков Cys. Было обнаружено, что в молекуле отсутствуют свободные сульфгидрильные группы (т. е. все остатки Cys включены в дисульфидные связи). Спектрофотометрически показано наличие трех остатков Thr. В качестве N-концевой аминокислоты был идентифицирован Gly. В то же время при определении первичной структуры нативного белка с помощью газожидкостного секвенатора были обнаружены две последовательности, одна из которых начиналась с остатка Gly, а во второй на первом шаге был идентифицирован остаток Thr. Данный факт свидетельствовал о возможном наличии в составе молекулы эктатомина двух полипептидных цепей, скрепленных между собой дисульфидной связью (связями). Электрофоретический анализ белка в восстановленных условиях подтвердил присутствие в молекуле двух близких по массам (3,5 кДа) полипептидных цепей (рис. 1б).

Дальнейший анализ первичной структуры эктатомина проводили на отдельных полипептидных цепях (А и В), выделенных с помощью ВЭЖХ с обращенной

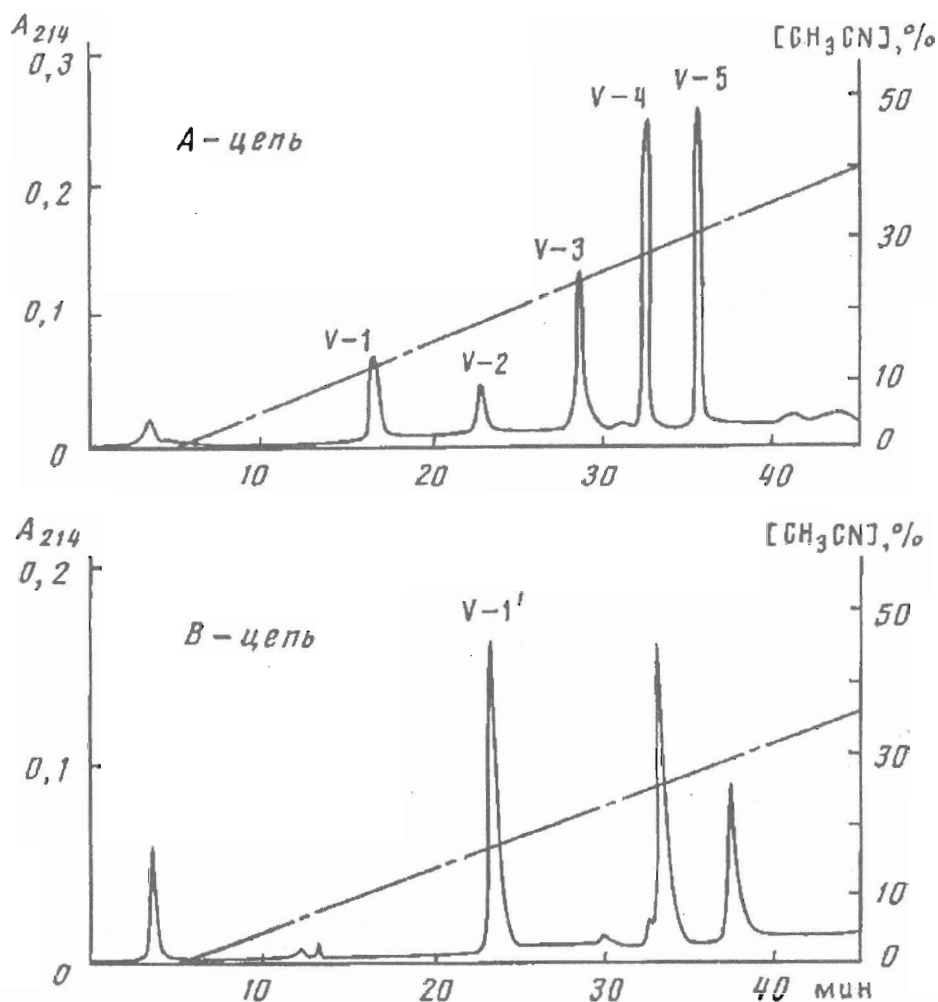


Рис. 2. Разделение продуктов расщепления пиридилэтилированных цепей А и В эктатомина стафилококковой протеиназой на колонке Ultrapore RPSC, 5 мкм (0,46 × 7,5 см) в 0,1% трифторуксусной кислоте в градиенте концентрации ацетонитрила

фазой после полного восстановления в его молекуле дисульфидных связей и модификации SH-групп винилпиридином. С помощью газофазного секвенатора были установлены первые 20 N-концевых аминокислотных остатков цепи А и 24 — цепи В (таблица). В качестве С-концевых аминокислот были идентифицированы Leu для цепи А и Lys для цепи В. Затем для каждой цепи был проведен исчерпывающий гидролиз стафилококковой протеиназой V8. В каждом случае были выделены индивидуальные пептиды (рис. 2) и определены их аминокислотные последовательности (таблица). По данным аминокислотного анализа, молекула эктатомина содержит только один остаток Arg. Поэтому для полной реконструкции цепи А был проведен ее дополнительный гидролиз эндопротеиназой Arg-C. С помощью ВЭЖХ суммарного гидролизата были выделены пептиды, один из которых имел аминокислотную последовательность, перекрывающую С-концевую область этой цепи (таблица).

Использование для детекции при разделении продуктов гидролиза сканирующего проточного спектрофотометра значительно упрощало задачу определения в пептидах Trp и Tug, а также позволило однозначно идентифицировать пептиды,

Аминокислотная последовательность пептидных фрагментов эктатомина

Фрагмент*	Аминокислотная последовательность
<u>Цепь А</u>	
Н-Концевой	G-V-I-P-K-K-I-W-E-T-V-C-P-T-V-E-P-W-A-K
V-1	C-G-K-L
V-2	I-A-T-Y-I-K-R-E
V-3	T-V-C-P-T-V-E-P-W-A-K-K-C-S-G-D
V-4	C-V-I-P-K-K-I-W-E
V-5	T-V-C-P-T-V-E-P-W-A-K-K-C-S-G-D-I-A-T-Y-I-K-R-E
A-1	E-C-G-K-L
<u>Цепь В</u>	
Н-Концевой	W-S-T-I-V-K-L-T-I-C-P-T-L-K-S-M-A-K-K-C-E-G-S-I
V-1'	G-S-I-A-T-M-I-K-K-K-C-D-K

\* V — фрагменты гидролиза стафилококковой протеиназой; А — фрагмент гидролиза протеиназой Arg-C.

содержащие модифицированные остатки Cys. В связи с этим в ряде случаев не было необходимости секвенирования всех полученных фрагментов. Таким образом, именно с учетом спектральных характеристик и молекулярной массы пептидов, полученных при разделении продуктов гидролиза стафилококковой протеиназой, для секвенирования были выбраны фрагменты, необходимые для полной реконструкции полипептидной цепи (таблица). В целом полученные результаты позволили установить полную аминокислотную последовательность молекулы эктатомина (рис. 3).

На основании первичной структуры эктатомина была рассчитана молекулярная масса (7928 Да) и изоэлектрическая точка 9,95. Среди низкомолекулярных белков-токсинов эктатомина один из немногих, имеющих двухцепочечную структуру. Совсем необычна и высокая степень внутренней межцепочечной гомологии — 16 аминокислотных остатков (в том числе все остатки Cys) в обеих полипептидных цепях инварианты.

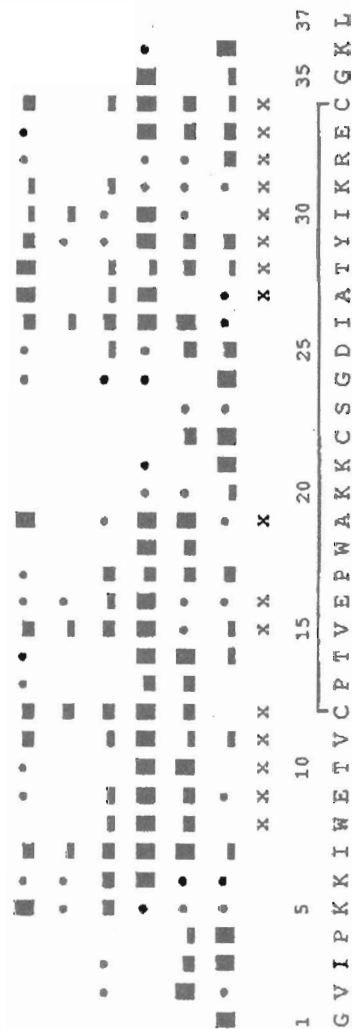
Для установления пространственного строения молекулы эктатомина в водном растворе использовались методики двумерной спектроскопии ЯМР. Спиновые системы протонов отдельных аминокислотных остатков были выделены с использованием спектров DQF-COSY и TOCSY. Отнесение сигналов к определенному положению остатков в первичной структуре было выполнено посредством анализа  $d_{\alpha N}(i, i+1)$ -,  $d_{\beta N}(i, i+1)$ - и  $d_{\gamma N}(i, i+1)$ -связей ЯЭО между амидным протоном  $(i+1)$ -го остатка и соответственно протонами  $C^{\alpha}H$ ,  $C^{\beta}H$  и  $NH$  предыдущего по аминокислотной последовательности  $i$ -го остатка [4]. Найденные  $d$ -связи ЯЭО суммированы на рис. 4.

Расчет пространственной структуры основывался на объемах кросс-пиков, измеренных в спектре NOESY с временем смешивания 200 мс, зарегистрированным



α-спираль

$d_{\alpha B}(i, i+3)$   
 $d_{\alpha N}(i, i+4)$   
 $d_{\alpha N}(i, i+3)$   
 $d_{NN}(i, i+1)$   
 $d_{\beta N}(i, i+1)$   
 $d_{\alpha N}(i, i+1)$   
 H-D-обмен



H-D-обмен  
 $d_{\alpha N}(i, i+1)$   
 $d_{\beta N}(i, i+1)$   
 $d_{NN}(i, i+1)$   
 $d_{\alpha N}(i, i+3)$   
 $d_{\alpha N}(i, i+4)$   
 $d_{\alpha B}(i, i+3)$

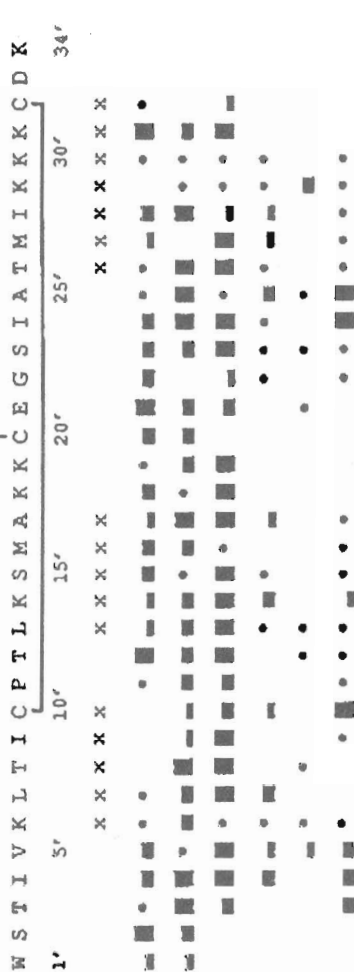


Рис. 4

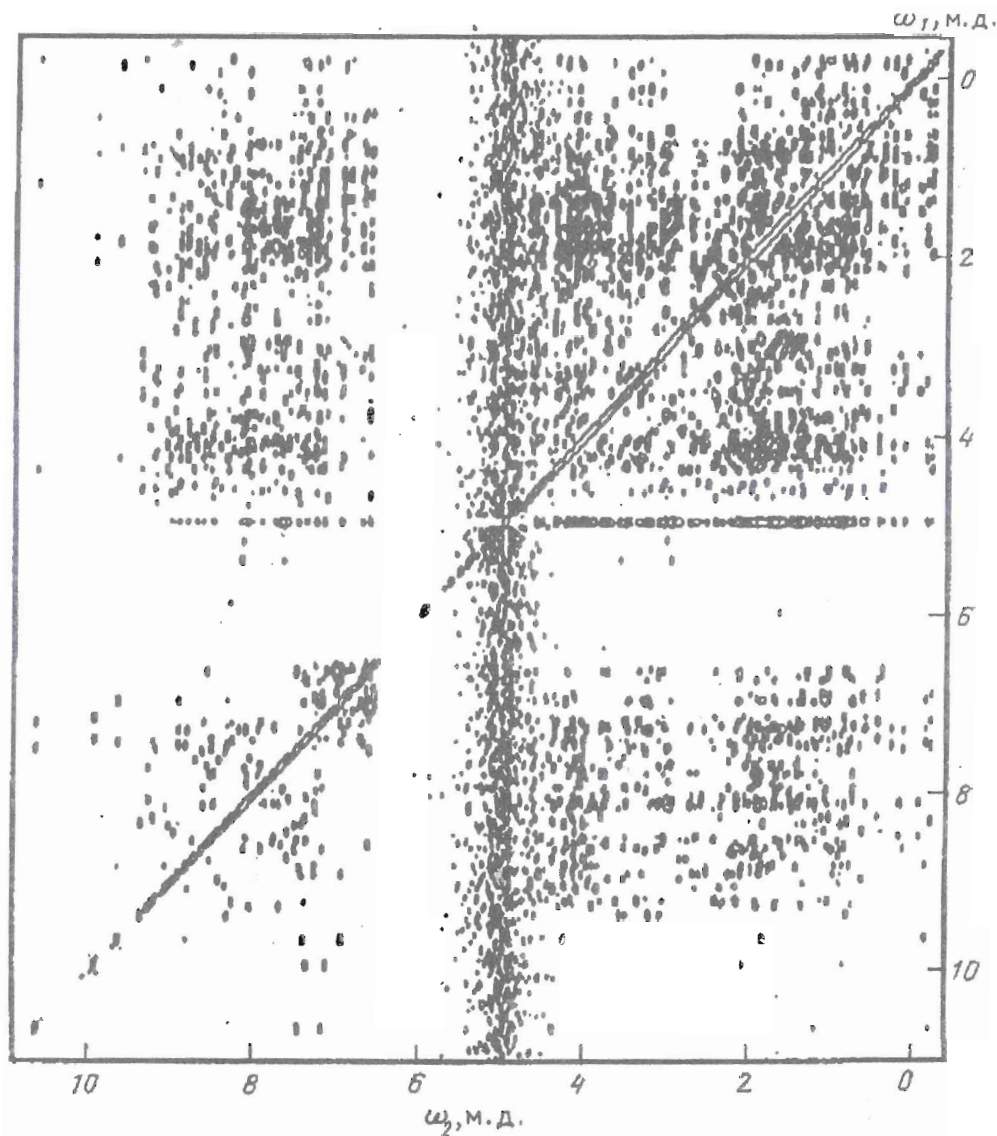


Рис. 5. Спектр NOESY (время смешивания 200 мс) эктатомина в  $H_2O$  (pH 3,0;  $10^\circ C$ )

получен окончательный набор конформаций эктатомина, согласующихся с экспериментальными данными и обладающих низкой энергией ( $-868 \pm 31$  кДж/моль).

Из-за высокой степени гомологии в первичной структуре двух цепей эктатомина наблюдается гомология и в их пространственном строении. Каждая цепь образует «шпильку» из двух антипараллельных  $\alpha$ -спиралей, соединенных короткой петлей

Рис. 4. Аминокислотная последовательность цепей А (вверху) и В (внизу) эктатомина, положение дисульфидных связей и карта  $d$ -связей с участием NH,  $C^{\alpha}H$  и  $C^{\beta}H$  (протоны  $C^{\beta}H$  остатков пролина рассматривались как протоны NH). Высота темных прямоугольников характеризует интенсивности кросс-пиков ЯЭО в спектре NOESY. Кружком отмечены  $d$ -связи, которым соответствуют перекрытые кросс-пики ЯЭО. В правой части диаграммы показан набор  $d$ -связей, характерных для канонической правой  $\alpha$ -спирали [4]. Прямоугольниками отмечены  $\alpha$ -спиральные участки молекулы эктатомина, крестиками обозначены остатки с замедленным обменом протонов NH на дейтерий растворителя (т. е. присутствующие в спектре NOESY, накопленном сразу после растворения лиофилизованного образца в  $D_2O$ )

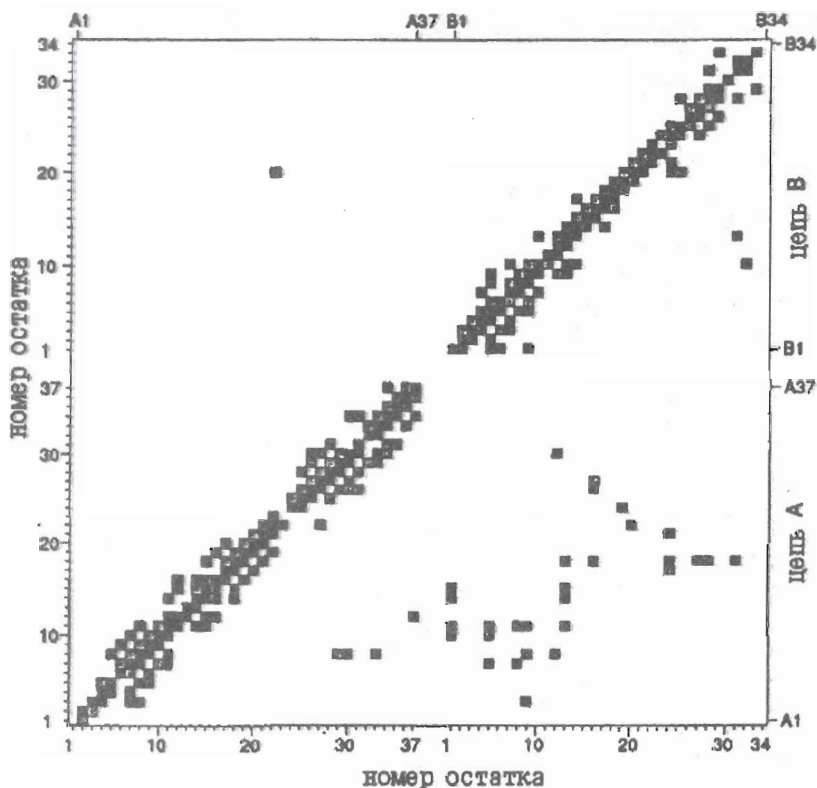


Рис. 6. Однозначно отнесенные кросс-пики ЯЭО представлены в виде диагональной диаграммы. Над диагональю показаны контакты между протонами основной цепи, под диагональю — между всеми протонами соответствующих остатков. Интенсивность закрашивания квадратов пропорциональна количеству ЯЭО-контактов

из 4 аминокислотных остатков (рис. 7а, б). При этом внутрицепочечные дисульфидные связи стабилизируют структуру «шпильки». Две цепи соединены дисульфидной связью между остатками цистеина, находящимися на петлевых участках. В водном растворе две цепи упакованы таким образом, что молекула образует структуру типа 4-спиральной связки [10]. При этом относительное расположение двух цепей стабилизируется за счет нековалентных взаимодействий между двумя цепями. N- и C-концевые участки обеих цепей подвижны, в то время как структура 4-спиральной связки хорошо определена (попарно усредненные по 20 конформациям среднеквадратичные отклонения координат тяжелых атомов на участках Lys5-Gly35 (цепь А), Thr3-Lys32 (цепь В) и на основной цепи этих участков составили  $1,38 \pm 0,19$  и  $0,75 \pm 0,21$  Å соответственно).

Таким образом, эктатомин имеет очень необычное пространственное строение. Поиск по базе данных (Brookhaven Protein Data Bank) не выявил белков, имеющих сходную пространственную структуру.  $\alpha$ -Спиральное строение, как правило, преобладает у мембранных белков, а также у мембраноактивных токсинов (например, меллитин, колицины А и Е1). Кроме того, обе цепи эктатомина имеют ярко выраженную амфифильную структуру (рис. 7а). Преобладание положительных зарядов на поверхности молекулы делает возможным ее взаимодействие с отрицательно заряженными молекулами (например, с липидами). Эти особенности пространственного строения эктатомина позволяют предположить возможность его взаимодействия с клеточными мембранами.





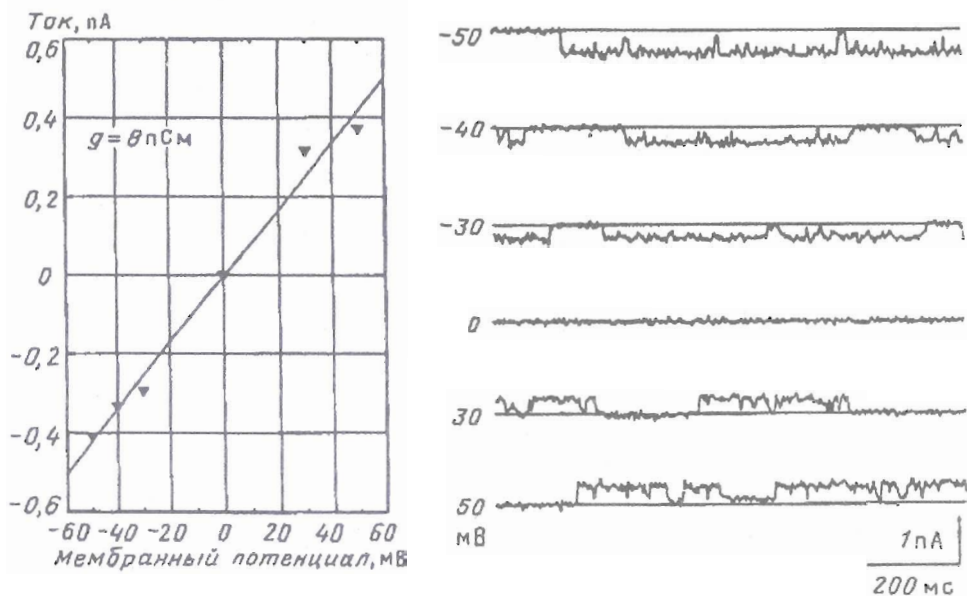


Рис. 8. Вольт-амперная характеристика канала (слева) и примеры трасс с записями работы канала (справа), образуемого эктатомином в мембране ооцита *X. laevis*

Эктатомин в концентрации 0,5—1 мкМ при действии на целые ооциты *Xenopus laevis* и клетки миокарда крысы вызывал постепенный необратимый рост утечки ионов через мембрану, уменьшение сопротивления мембраны и гибель клетки.

Эксперименты по методу «patch clamp» (метод фиксации потенциала на мембранном фрагменте) показали, что эктатомин обладает каналобразующими свойствами. В концентрации 0,05—0,1 мкМ эктатомин образовывал каналы в мембране ооцитов *X. laevis* в конфигурации «inside-out» при добавлении как с внешней, так и с внутренней стороны мембраны. Проводимость одиночного канала составила 8 пСм (рис. 8). Потенциал реверсии тока, протекающего через канал, был равен ~0 мВ. Это значение потенциала реверсии указывает на то, что канал, образуемый эктатомином, обладает неселективной катионной проводимостью.

Результаты, полученные на ооцитах, были подтверждены на модельных мембранных системах. В экспериментах на бислойных липидных мембранах (рис. 9а) показано, что добавление эктатомина с цис-стороны индуцирует в мембране долгоживущие каналы с проводимостью около 70 пСм. Так же как и в экспериментах на ооцитах, эти каналы более проницаемы для катионов, чем для анионов ( $P_{Na^+}/P_{Cl^-} = 2$ , где  $P$  — проницаемость канала для соответствующего иона). Различия в значениях проводимости одиночных каналов, полученных на ооцитах и бислойных липидных мембранах, могут быть объяснены различием в липидном составе мембран и наличием в клеточных мембранах интегральных белков. Образование каналов зависит от потенциала и происходит только при положительном цис-потенциале, что соответствует физиологическим условиям. Анализ зависимости мембранной проводимости от концентрации (рис. 9б) показывает, что в образовании поры принимают участие две молекулы эктатомина.

Таким образом, эктатомин может встраиваться в мембрану, образуя канал. Очевидно, что при встраивании в мембрану происходит конформационная перестройка молекулы: неполярные остатки экспонируются наружу, а заряженные — во внутреннюю часть мембранной поры. Амфифильная структура обеих цепей позволяет молекуле осуществить такую перестройку без существенного изменения

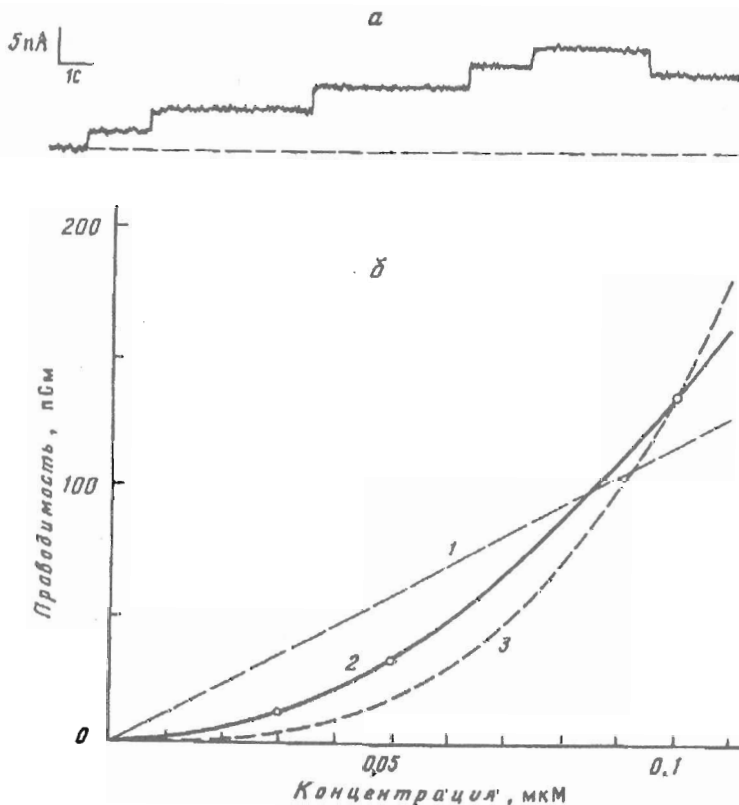


Рис. 9. Каналы, образуемые эктатомином в бислойных липидных мембранах. *a* — пример трассы с записью каналов. Концентрация эктатомина, 0,01 мкМ (только с *цис*-стороны) в симметричном буфере; *б* — зависимость равновесной мембранной проводимости от концентрации эктатомина. Показаны экспериментальные точки, полученные при мембранном потенциале 70 мВ, и теоретические кривые, рассчитанные для одной (1), двух (2) и трех (3) молекул эктатомина, участвующих в образовании каналов

вторичной структуры, так как при изменении конформаций межцепочечной дисульфидной связи и петлевых участков обеих цепей молекула может образовать или развернутую амфифильную, или «вывернутую» гидрофобную структуру. В обоих случаях молекула должна димеризоваться: в первом случае для придания структуре гидрофобности, а во втором — для компенсации разности между толщиной липидного бислоя и длинной одиночной спирали эктатомина.

Высокое содержание эктатомина в яде (~ 18%), скорее всего, коррелирует с каналобразующим эффектом, вызывающим в микромолярных концентрациях разрушение клеточных мембран, приводящее к гибели клеток, и может объяснять высокую токсичность яда. В то же время при сравнении аминокислотных последовательностей А- и В-цепей эктатомина с последовательностями известных структур в белковом банке данных выявлен ряд совпадающих или высокоомологичных участков. На наш взгляд, интересна гомология фрагмента 10—17 цепи А и 8—15 цепи В с последовательностью консервативного участка TVCPTVKP тирозинкиназозависимых трансформирующих белков из разных источников [11, 12]. Достаточно высокая гомология наблюдается и для последовательности 24—34 полипептидной цепи В эктатомина с фрагментом IATMKKKGЕК  $\gamma$ -интерферон-индуцируемого белка [13]. Эти данные позволяют предположить, что наряду с каналобразующей функцией эктатомин может проникать внутрь клетки и воздействовать на внутриклеточные процессы.

## Экспериментальная часть

Муравьи *Ectatomma tuberculatum* были собраны в Амазонской сельве (департамент Укаяли, Перу). Цельный яд получали с помощью тактильной стимуляции пинцетом брюшка муравья и собирали в губку. После экстракции 0,1 М аммоний-бикарбонатным буфером (рН 8,1) яд дважды лиофилизовали.

**Выделение эктатамина.** 40 мг экстракта цельного яда растворяли в 1 мл аммоний-бикарбонатного буфера (рН 8,1) и центрифугировали при 5000g в течение 5 мин. Осадок ресуспендировали и повторно центрифугировали. Операцию повторяли дважды. Суммарный супернатант наносили на колонку (2,5 × 90 см) с сефадексом G-50f, уравновешенным тем же буфером. Элюцию проводили при скорости 31 мл/ч. Фракцию, токсичную для мышей, лиофилизовали и разделяли ВЭЖХ с обращенной фазой на жидкостном хроматографе System Gold с проточным сканирующим детектором (модель 167, Beckman, США).

Молекулярную массу белка и его полипептидных цепей определяли при помощи электрофореза на приборе модели Midget (LKB, Швеция) в ПААГ по методике [14]. В качестве маркерных пептидов использовали фрагменты бромцианового щепления миоглобина (M 2512—16 949 Да) фирмы BDH (Великобритания).

**Определение биологической активности.** Тестирование токсичных фракций яда и эктатамина на мышах (15—20 г) осуществляли интрацеребровентрикулярным введением 3—5 мкл водного раствора образцов с концентрацией 0,03—1 мкг/мкл. Токсичность цельного яда и эктатамина для тараканов *Blata orientalis* определяли путем введения 2—5 мкл водного раствора с концентрацией 0,3—2 мкг/мкл во второй грудной сегмент. Значение LD<sub>50</sub> определяли по методу Литчфильда и Уилкоксона [15], используя по 5 животных в каждой группе.

N-Концевую аминокислоту идентифицировали в виде Dns-производного по модифицированному методу Грэя [16] с помощью микротонкослойной хроматографии на силикагеле. Для анализа C-концевой аминокислотной последовательности полипептидных цепей использовали карбоксипептидазы А и В [17]; отщепленные аминокислоты идентифицировали в виде Dns-производных.

Аминокислотный состав эктатамина определяли на аминокислотном анализаторе модели D-500 (Durrum, США) после 24 и 72 ч гидролиза в 6 н. HCl при 105° С. Содержание остатков триптофана оценивали спектрофотометрически при 280 нм, используя молярный коэффициент поглощения 5579 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>. Для обнаружения свободных сульфгидрильных групп использовали 5,5'-дитиобис(2-нитробензойную кислоту) [18].

**Аминокислотную последовательность** полипептидных цепей эктатамина и их фрагментов устанавливали с помощью автоматической деградации на газофазном секвенаторе 470A (Applied Biosystems, США) с идентификацией фенилтиогидаптоиновых производных аминокислот.

**Восстановление и алкилирование белка.** 15 нмоль эктатамина растворяли в 0,3 мл буфера (0,2 М трис-HCl, рН 8,0; 6 М гуанидин-HCl, 2 мМ EDTA), продували азотом и после добавления 150-кратного молярного избытка DTT инкубировали при 37° С 18 ч. Затем проводили алкилирование 4-винилпиридином при 20° С по методике [19].

Разделение полипептидных цепей А и В после восстановления и алкилирования проводили ВЭЖХ с обращенной фазой на колонке Ultrapore RPSC (0,46 × 7,5 см, Beckman, США) в линейном градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте.

**Гидролиз протеиназой V8 из Staphylococcus aureus.** К 3 нмоль пиридилэтилированной цепи А или В в 50 мкл 50 мМ трис-HCl-буфера (рН 7,8) добавляли стафилококковую протеиназу в соотношении фермент — субстрат 1 : 15 и инкубировали 6 ч при 37° С. Гидролизат разделяли обращенно-фазовой ВЭЖХ.

**Гидролиз цепи А эндопротеиназой Arg-C** осуществляли по методике [20] на 3 нмоль пиридилэтилированного полипептида. Гидролизат разделяли на колонке

Ultrapore RPSC (0,46 × 7,5 см, Beckman, США) линейным увеличением концентрации ацетонитрила (1% в мин) в присутствии 0,1% трифторуксусной кислоты.

**Спектроскопия ЯМР.** Для получения спектров ЯМР 3 мг лиофилизированного белка растворяли в 150 мкл воды (10% D<sub>2</sub>O для внутреннего лока). Концентрация белка составляла 2,5 мМ, рН 3,0. Для измерения скорости дейтерообмена амидных протонов лиофилизированный образец растворяли в 150 мкл D<sub>2</sub>O и спектр NOESY снимали сразу же после растворения.

Для улучшения подавления сигнала воды все ЯМР-эксперименты проводили в 5-мм толстостенных ампулах. Двумерные спектры <sup>1</sup>H-ЯМР (600 МГц) NOESY (задержка на релаксацию 1,2 с, времена смешивания 100 и 200 мс), TOCSY (время смешивания 50 мс) и DQF-COSY снимали в фазоизбирательном режиме на спектрометре Unity 600 (Varian, США) при 10 и 30° С. Во время периодов релаксации и смешивания сигнал воды насыщался слабым радиочастотным полем.

Математическую обработку спектров производили программами VNMR (Varian, США) и EASY (ETH, Швейцария). Объемы кросс-пиков в NOESY-спектрах были измерены методом интегрирования на основе референсных форм линий (метод Денка [21]) с помощью программы EASY [22].

**Расчет структуры** проводили с помощью программы дистанционного алгоритма DIANA [6, 7] на компьютере Sun Sparc Station 1+. В качестве экспериментальных данных на предварительном этапе использовали ограничения сверху на межпротонные расстояния, полученные с помощью калибровки по «1/r<sup>6</sup>» [8]. На последующих этапах вводили ограничения на межпротонные расстояния сверху и снизу, полученные с помощью программы MARDIGRAS, ограничения на дисульфидные (2,0—2,1 Å на расстояние Sβ — Sβ и 3,0—3,1 Å на Sβ — Cβ) и водородные (1,8—2,0 Å на расстояние O — HN и 2,7—3,0 Å на O — N) связи.

Структуры, полученные программой DIANA, были уточнены посредством минимизации энергии с помощью программы CHARMM [9] (версия 21.1.7b). Минимизацию проводили без ограничений, с учетом всех атомов водорода, присутствующих в молекуле.

**Исследование каналаобразующей функции.** Ооциты были получены от взрослых самок лягушек *Xenopus laevis* под общей анестезией и поддерживались в культуре, как было описано ранее [23]. Одиночные каналы, образуемые эктатомином в мембране, регистрировали по методу [24] с модификациями [25].

Бислойные липидные мембраны формировали из двух монослоев фосфатидилхолина (тип III-s, Sigma, США) на границе раздела вода — воздух по методу «tip-dip» [26]. Проводимость измеряли по стандартной схеме фиксации напряжения [27] при симметричных и несимметричных буферных растворах. Симметричный буфер содержал: 145 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ HEPES (рН 7,4) по обе стороны от мембраны. Несимметричный буфер содержал 145 мМ NaCl в *цис*-отсеке против 48 мМ NaCl в *транс*-отсеке, при этом содержание остальных солей в обоих отсеках было такое же, как и в симметричном буфере.

Катион/анионную селективность определяли исходя из значения потенциала реверсии при несимметричных буферных растворах [28]. Число молекул (*N*), участвующих в образовании канала, определяли из анализа зависимости проводимости мембраны (*G*) от концентрации эктатомина (*C*) при постоянном мембранном потенциале (*V*):

$$G = \Gamma C^N \exp(V/V_c),$$

где  $\Gamma$  и  $V_c$  — константы [29].

Авторы признательны И. В. Назимову, Г. А. Гришиной и Е. Н. Чертовой за определение аминокислотной последовательности пептидов на газофазном секвенаторе. Работа финансировалась Российским фондом фундаментальных исследований (РФФИ).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schmidt J. O. // Venoms of Hymenoptera/Eds T. Plek. N. Y.: Acad. Press, 1986. P. 425—508.
2. Blum M. S. // J. Toxicol.—Toxin Reviews. 1992. V. 11. № 2. P. 115—164.
3. Schmidt J. O., Blum M. S., Overal W. L. // Toxicon. 1986. V. 24. № 9. P. 907—921.
4. Wüthrich K. NMR of Proteins and Nucleic Acids. N. Y.: Wiley, 1986.
5. Borgias B. A., James T. L. // J. Magn. Res. 1990. V. 87. P. 475—487.
6. Güntert P., Qian Y. Q., Otting G., Müller M., Gehring W., Wüthrich K. // J. Mol. Biol. 1991. V. 217. P. 531—540.
7. Güntert P., Wüthrich K. // J. Biomol. NMR. 1991. V. 1. № 4. P. 447—456.
8. Barsukov I. L., Nolde D. E., Lomize A. L., Arseniev A. S. // Eur. J. Biochem. 1992. V. 206. № 3. P. 665—672.
9. Brooks B. R., Brucolleri R. E., Olafson B. D., States D. G., Swamanithan S., Karplus M. // J. Comput. Chem. 1988. V. 4. P. 187—217.
10. Weber P. C., Salemme F. R. // Nature. 1980. V. 287. № 4. P. 82—84.
11. Sukegawa J., Semba K., Yamanashi Y., Nishizawa M., Miyajima N., Yamamoto T., Toyoshima K. // Mol. Cell. Biol. 1987. V. 7. № 1. P. 41—47.
12. Kitamura N., Kitamura A., Toyoshima K., Hirauma Y., Yoshida M. // Nature. 1982. V. 297. P. 205—208.
13. Luster A. D., Unkeless J. C., Ravetch J. V. // Nature. 1985. V. 315. P. 672—676.
14. Schagger H., von Jagow G. // Anal. Biochem. 1987. V. 166. P. 368—379.
15. Белецкий Л. М. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л.: Гос. изд-во мед. лит-ры, 1963. С. 81.
16. Gray W. P. // Meth. Enzymol. 1967. V. 11. P. 248—254.
17. Ambler R. P. // Meth. Enzymol. 1972. V. 25. P. 143—154.
18. Ellmann G. L. // Arch. Biochem. and Biophys. 1959. V. 82. № 1. P. 70—77.
19. Inglis A. S., McMahon D. T. W., Roxburgh C. M., Takayanagi H. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 1. P. 86—94.
20. Schenkein J., Levy M., Franklin E. C., Frangione B. // Arch. Biochem. and Biophys. 1977. V. 182. № 1. P. 64—70.
21. Denk W., Baumann R., Wagner G. // J. Magn. Reson. 1986. V. 67. № 2. P. 386—390.
22. Eccles S., Güntert P., Billeter M., Wüthrich K. // J. Biomol. NMR. 1991. V. 1. № 2. P. 111—130.
23. Filippov A. K., Kobrinsky E. M., Tsurupa G. P., Pashkov V. N., Grishin E. V. // Neurosci. 1990. V. 39. P. 809—814.
24. Methfessel C., Witzemann V., Takanashi T., Mishina M., Numa S., Sakmann B. // Pflügers Arch. 1986. V. 407. № 6. P. 577—588.
25. Filippov A. K., Tertishnikova S. M., Alekseev A. E., Tsurupa G. P., Pashkov V. N., Grishin E. V. // Neurosci. (in press).
26. Coronado R., Latorre R. // Biophys. J. 1983. V. 43. P. 231—236.
27. Mueller P., Rudin D. O., Tien H. T., Wescot W. C. // Nature. 1962. V. 194. P. 979—980.
28. Hille B. Ionic Channels of Excitable Membranes. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Mass, 1984.
29. Latorre R., Alvarez O. // Physiol. Rev. 1981. V. 61. P. 77—150.

Поступила в редакцию  
14.III.1994

K. A. Pluzhnikov, D. E. Nolde, S. M. Tertishnikova\*,  
S. V. Sukhanov, A. G. Sobol, M. Yu. Torgov, A. K. Filippov\*,  
A. S. Arseniev, E. V. Grishin

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STUDIES OF TOXIC PRINCIPLE  
OF *Ectatomma tuberculatum* ANT VENOM

M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,  
Russian Academy of Sciences, Moscow;

\* Branch of the M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of  
Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Puschino, Moscow Region

Key words: ant venom; ectatomin; toxins, proteins, NMR; structure primary, secondary, spatial; ion channels.

A toxic principle of the *Ectatomma tuberculatum* ant venom called ectatomin was isolated. Ectatomin is a protein with molecular weight 7928 Da. Its complete amino acid sequence and spatial structure in aqueous solution were determined by protein chemistry methods and NMR spectroscopy techniques. Ectatomin contains two highly homologous polypeptide chains linked to each other by a disulfide bond. The chains consist of 37 and 34 amino acid residues with an internal disulfide bridge in each. In aqueous solution the molecule forms a bundle of four amphipathic  $\alpha$ -helices. This toxin in a concentration of 0.05–0.1 mM forms potential dependent nonselective cation channels both in cell and artificial membranes. The channel is dimeric and the mechanism of its formation can be explained in terms of the spatial structure established.

---

Correspondence to: Dr. Pluzhnikov K. A. Institute of Bioorganic Chemistry RAS, ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow V-437, 117871, Russia.