



УДК 577.112.5:615.919:595.44-114.52.088

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ЧАСТИЧНАЯ СТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ ТОКСИЧЕСКИХ КОМПОНЕНТОВ ЯДА

### ПАУКА *Latrodectus pallidus*

© 1997 г. А. Р. Чараха\*, Л. В. Шевченко, А. К. Молодкин\*, К. А. Плужников#,  
Т. М. Волкова, Е. В. Гришин

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

\* Российский университет дружбы народов

Поступила в редакцию 03.06.96 г.

Выделены и охарактеризованы токсичные компоненты яда паука *Latrodectus pallidus*. Показано, что этот яд содержит токсин, специфичный для млекопитающих, и по крайней мере один токсин, специфичный для насекомых. Определена частичная аминокислотная последовательность этих двух токсинов, обнаружена их высокая структурная гомология с ранее изученными соответственно:  $\alpha$ -латротоксином и  $\alpha$ -латроинсектотоксином из яда паука *Latrodectus mactans tredecimguttatus*.

**Ключевые слова:** нейротоксины, *Latrodectus*, первичная структура.

Род *Latrodectus* из семейства пауков-тенетников наиболее известен, и все 12 видов пауков этого рода ядовиты. Несмотря на то что исследования их ядов проводятся уже более полувека, только в последние 5–7 лет получена достаточно детальная и важная информация о структуре и функциях компонентов ядов [1–5]. Наиболее изучен в настоящее время яд паука *L. mactans tredecimguttatus*. Из него было выделено семейство высокомолекулярных нейротоксинов ( $M$  110–130 кДа), среди которых обнаружены высокоселективные инсектотоксины, нейротоксины для млекопитающих и ракообразных [6–8]. Показано, что эти токсины при наномолярных концентрациях вызывают массивный выброс нейромедиаторов, ведущий к блокаде передачи нервного импульса. Осуществлено клонирование и определена структура кДНК, кодирующих  $\alpha$ -латротоксин ( $\alpha$ -ЛТ) [3],  $\alpha$ -латроинсектотоксин ( $\alpha$ -ЛИТ) [4] и  $\delta$ -латроинсектотоксин [5]. Исследование новых токсических компонентов ядов других представителей этого рода пауков позволит получить ценную информацию о структурно-функциональной организации токсинов этого семейства и понять причину высокой селективности их действия.

Данная работа посвящена выделению и частичной структурной характеристике основного инсектотоксического компонента ( $\alpha$ -ЛИТ- $p$ ) и токсина для млекопитающих ( $\alpha$ -ЛТ- $p$ ) из яда паука *L. pallidus*.

Сокращения:  $\alpha$ -ЛИТ- $p$ ,  $\alpha$ -ЛТ- $p$  и  $\alpha$ -ЛИТ,  $\alpha$ -ЛТ – соответственно  $\alpha$ -инсектотоксины и  $\alpha$ -латротоксины из яда пауков *Latrodectus pallidus* и *L. mactans tredecimguttatus*.

# Автор для переписки.

*du*, обладающего достаточно выраженной токсичностью для позвоночных и различных видов насекомых. Летальная доза яда этого паука при внутривенном введении мышам составляла 17 мг/кг. Инъекция его тараканам в дозах от 30 до 79 мкг/г вызывала паралитический и/или летальный эффект. Аналогичное действие наблюдалось на личинках домашней мухи в дозе 80 мкг/г.

Согласно электрофоретическому анализу (рис. 1), яд паука *L. pallidus* представляет собой многокомпонентную белковую смесь и состоит в основном из двух групп белков с  $M$  60–70 и 100–130 кДа. Кроме того, в яде присутствуют также компоненты с  $M$  30–45 кДа и в меньшей степени представлены низкомолекулярные полипептиды. Сравнение электрофоретических характеристик белковых компонентов яда *L. pallidus* и яда хорошо изученного паука *L. m. tredecimguttatus* (рис. 1) показало их достаточно высокое сходство. Однако высокомолекулярная группа белков (100–130 кДа) яда *L. pallidus* электрофоретически менее гетерогенна и представлена тремя полипептидами, в то время как в этом диапазоне молекулярных масс для яда *L. m. tredecimguttatus* наблюдается не менее пяти различных по своей электрофоретической подвижности белков.

Выделение основного инсектотоксического компонента и частичную очистку токсина для позвоночных из яда паука *L. pallidus* проводили с помощью ионообменной и гидрофобной высокоэффективной хроматографии по модифицированной методике, описанной в работе [9] для токсинов из яда паука *L. m. tredecimguttatus*. Биологическую

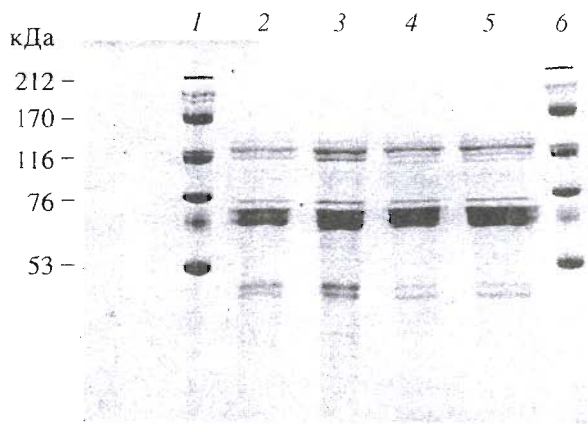


Рис. 1. Электрофоретический анализ цельных ядов пауков *L. pallidus* (2, 3) и *L. m. tredecimguttatus* (4, 5) в 10% SDS-ПААГ. В опытах 2 и 4 внесено по 5 мкг, а в опытах 3 и 5 – по 8 мкг цельного яда. 1 и 6 – смесь маркерных белков (Pharmacia, Швеция), сверху вниз: миозин,  $\alpha$ -2-макроглобулин,  $\beta$ -галактозидаза, трансферрин, глутаматдегидрогеназа.

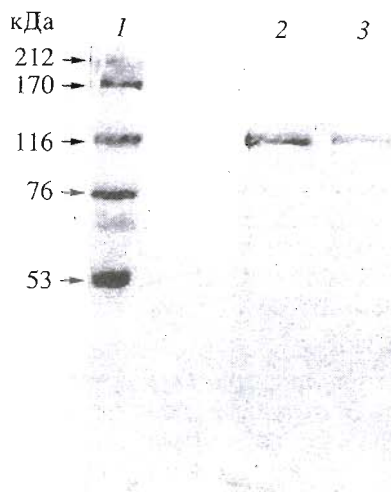


Рис. 2. Электрофоретический анализ в 10% SDS-ПААГ: 1 – смеси маркерных белков (см. рис. 1); 2 –  $\alpha$ -ЛИТ-р после окончательной очистки на колонке MonoQ HR 5/5 в 25 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  при pH 6.5; 3 –  $\alpha$ -ЛИТ-р, выделенного с помощью иммуноаффинной хроматографии.

активность фракций на каждой стадии хроматографического разделения тестировали на личинках мухи и мышях. В результате первичного фракционирования цельного яда на анионообменной колонке Mono Q в градиенте концентрации хлористого натрия при pH 8 было обнаружено, что белковая фракция, элюируемая в области 200–310 мМ NaCl, обладает выраженной токсичностью по отношению к насекомым и совпадает по месту хроматографического выхода с основ-

ной инсектотоксической фракцией при разделении в этих условиях яда *L. m. tredecimguttatus* [9], тогда как белки, элюируемые 320–380 мМ NaCl, вызывают гибель мышей. Электрофоретический анализ этих фракций показал, что инсектотоксическая фракция в диапазоне молекулярных масс 100–130 кДа содержит несколько компонентов, тогда как фракция, токсичная для мышей, – только один белок (120 кДа); при этом в обоих случаях в смеси присутствует группа белков с  $M$  60–70 кДа.

Инсектотоксическая фракция была подвергнута дальнейшему разделению. При ее рехроматографии на колонке Mono Q в градиенте концентрации хлористого натрия при pH 6.3 удалось отделить большую часть примесных белков с  $M$  60–70 кДа. В результате последующей гидрофобной хроматографии на колонке Phenil Superose в обратном градиенте концентрации сульфата аммония и окончательной очистки на анионообменной колонке Mono Q в градиенте концентрации хлористого натрия при pH 6.5 был получен индивидуальный белок с  $M$  120 кДа (рис. 2, 2), высокоактивный по отношению к насекомым (для личинок мухи  $\text{LD}_{100}$  2 мкг/г). Таким образом, с помощью ионообменной и гидрофобной хроматографии был выделен индивидуальный токсин для насекомых ( $\alpha$ -ЛИТ-р) и частично очищен токсин для позвоночных животных ( $\alpha$ -ЛТ-р).

Сходство хроматографических и электрофоретических характеристик, а также предварительное тестирование биологической активности полученных белков позволили предположить, что они могут быть близкими гомологами  $\alpha$ -ЛИТ и  $\alpha$ -ЛТ соответствующих токсинов из яда близкородственного паука *L. m. tredecimguttatus*. Твердофазный ИФА [10] цельного яда и фракции, содержащей токсин для позвоночных, с использованием моноклональных антител против  $\alpha$ -ЛТ (A24) [11] подтвердил это предположение. В суммарном яде *L. pallidus* и в высокоочищенной фракции наблюдалось специфичное взаимодействие используемых антител с белковым компонентом с  $M$  120 кДа (рис. 3). Эти данные позволили в дальнейшем для одноэтапного выделения токсина к позвоночным ( $\alpha$ -ЛТ-р) использовать аффинную иммунохроматографию на иммобилизованных моноклональных антителах к  $\alpha$ -ЛТ [12]. При этом из 30 мг цельного яда было выделено 150 мкг гомогенного  $\alpha$ -ЛТ-р, который, по данным электрофореза в SDS-ПААГ, представлял собой белок с  $M$  120 кДа (рис. 2) и обладал токсическим действием по отношению к мышам ( $\text{LD}_{50}$  75 мкг/кг).

В результате автоматического секвенирования  $\alpha$ -ЛИТ-р свежевыделенного белка была установлена его N-концевая последовательность: Glu-Met-Ser-Xaa-Ala-Asp-Gln-Xaa-Xaa-Leu-Leu-Ala-Tyr-Ala-, которая полностью совпала с N-концевой последовательностью  $\alpha$ -ЛИТ [4]. В случае  $\alpha$ -ЛТ-р

N-концевую последовательность из пяти остатков (таблица) удалось определить только после иммунизации токсина на поливинилидендифторидной мембране.

С целью получения дополнительной структурной информации для  $\alpha$ -ЛТ-р было осуществлено его протеолитическое расщепление трипсином после предварительного восстановления и модификации иодуксусной кислотой SH-групп. Полученный гидролизат фракционировали ВЭЖХ на обращенной фазе (рис. 2). Было получено более 150 фракций, часть которых после рехроматографии была подвергнута автоматическому секвенированию. N-Концевые аминокислотные последовательности шести фрагментов  $\alpha$ -ЛТ-р приведены в таблице. При сравнении структур триптических пептидов  $\alpha$ -ЛТ-р и его N-концевого фрагмента с полной аминокислотной последовательностью  $\alpha$ -ЛТ (таблица) была обнаружена их чрезвычайно высокая гомология с различными участками этого токсина. Интересно, что наблюдается практически полная гомология пептидов  $\alpha$ -ЛТ-р (N-концевой фрагмент, 155-1, 22-7, 155-2) с участками функционально важного N-концевого домена молекулы  $\alpha$ -ЛТ (1-227). В то же время в пептиде фракции 129 по сравнению с C-концевым фрагментом  $\alpha$ -ЛТ (1062-1075) обнаружены три замены и одна делеция. Это обстоятельство согласуется с предположением о том, что эта часть молекулы латротоксина не содержит функциональных доменов и в связи с этим консервативность аминокислотной последовательности в ней может быть менее выраженной.

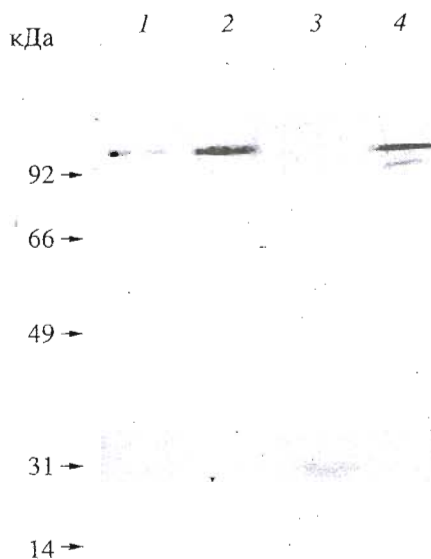


Рис. 3. Твердофазный ИФА после электрофоретического разделения в 10% SDS-ПААГ и электропереноса на нитроцеллюлозную мембрану: цельного яда *L. pallidus* (1); фракции яда *L. pallidus*, содержащей высокоочищенный  $\alpha$ -ЛТ-р (2); смеси маркерных белков (Bio-Rad, США), сверху вниз: фосфорилазы В, бычьего сывороточного альбумина, овальбумина, карбоангидразы, лизоцима (3); стрелками указано их положение, определенное по результатам предварительного окрашивания мембраны Ponceau S (Sigma, США); цельного яда *L. m. tredecimguttatus* (4).

Таким образом, полученные в данной работе результаты позволяют утверждать, что в яде паука *L. pallidus* содержатся токсины, гомологичные

N-Концевая последовательность пептидов триптического гидролизата  $\alpha$ -латротоксина из яда паука *L. pallidus* (верхняя строка) в сопоставлении с гомологичными участками структуры  $\alpha$ -латротоксина из яда паука *L. m. tredecimguttatus* (нижняя строка) [3]

Фракция*	Аминокислотная последовательность
N-Конец белка**	Glu-Leu-Ile-Asn-Leu- Glu-Leu-Ile-Asp-Leu- 1 5
155-1	Leu-Asp-Ile-Glu-Gln-Val-Leu-Leu- -Leu-Asp-Ile-Glu-Gln-Thr-Leu-Leu- 62 69
22-7	Leu-Asn-Asp-Tyr-Ile- -Leu-Asn-Asp-Tyr-Ile- 164 168
155-2	Thr-Pro-Thr-Asp-Asp-Ser-Leu-Gln-Ala-Pro-Leu-Phe-Ser-Ile-Ile- -Thr-Pro-Thr-Asp-Asp-Ser-Leu-Gln-Ala-Pro-Leu-Phe-Ser-Ile-Ile- 186 200
(85-87)-36	Gln-Leu-Ile-Asn-Leu- -Gln-Leu-Ile-Asn-Leu- 659 663
129	Leu- - -Val-Val-Gln-Ser-Leu-Ala-Val-Xaa-Ala-Val-Xaa-Phe- -Leu-Gln-Val-Val-Gln-Phe-Leu-Ala-Ala-Asn-Gly-Val-Asp-Phe- 1062 1075

\* Маркировка фракции включает ее номер на рис. 4 и номер пика при рехроматографии этой фракции.

\*\* Результат N-концевого анализа белка.

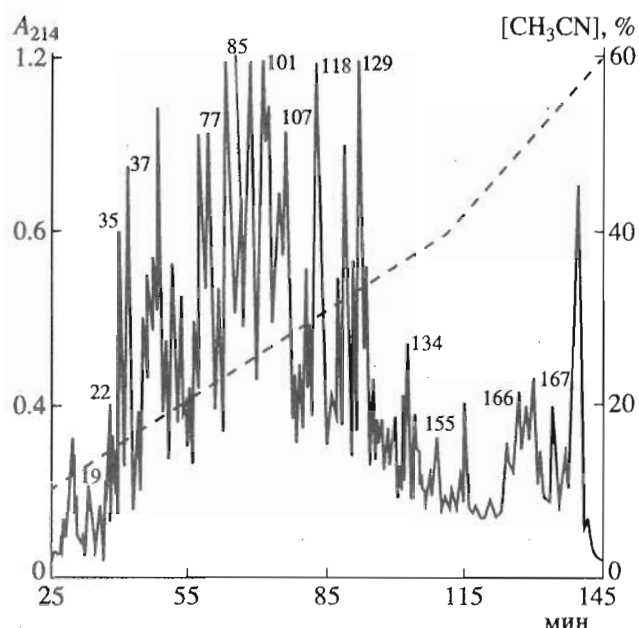


Рис. 4. Фракционирование триптического гидролизата карбоксиметилированного  $\alpha$ -ЛТ-р методом ВЭЖХ на обращенно-фазной колонке Ultrasphere ODS в 0.1% TFA в градиенте концентрации ацетонитрила. Скорость элюции 0.3 мл/мин.

семейству латротоксинов из яда паука *L. m. tredecimguttatus*. Дальнейшее их структурно-функциональное исследование позволит значительно расширить возможности детального изучения структурных доменов латротоксинов, ответственных за их различные функциональные активности и специфичность по отношению к разным видам животных.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Лиофилизированный цельный яд *L. pallidus* и *L. m. tredecimguttatus* получали на Ташкентском зоокомбинате и хранили до использования при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Были использованы реактивы и маркерные белки для SDS-ПААГ (Pharmacia, Швеция), трипсин (Serva, Германия), поливинилидендифторидные мембраны (иммобилон ТМ) (Millipore, США), нитроцеллюлоза BA85 (Schleicher und Schüll, Германия).

**Аналитические процедуры.** Количество белка во фракциях определяли по методу [13]. Электрофорез цельных ядов, фракций и очищенных компонентов проводили в 10% SDS-ПААГ [14], электроперенос белковых зон на поливинилидендифторид проводили в 10 мМ Na-боратном буфере (рН 9.5) по методу [15], а электроперенос на нитроцеллюлозу в трис-глициновом буфере — как описано в работе [16].

Твердофазный ИФА [10] осуществляли после электрофоретического разделения образцов ядов и переноса белковых зон на нитроцеллюлозу. При этом моноклональные антитела против  $\alpha$ -ЛТ (A24) [11] использовали в концентрации 0.5 мкг/мл, окрашивание проводили после инкубации с пероксидазным конъюгатом козьих антител против IgG мыши (Sigma, США), используя в качестве субстрата  $\beta$ -хлорнафтол, маркерные белки для SDS-ПААГ (Bio-Rad, США).

**Биологическое тестирование.** Определение токсической активности экстракта цельного яда и фракций проводили на лабораторных мышках линии BALB/C (15–20 г), личинках мухи *Musca domestica* (30–60 мг) и тараканах *Nauphoeta cinerea* (60–130 мг). Исследуемые образцы вводили в объеме 5–10 мкл: мышам — внутривенно, личинкам — в область пятого сегмента, тараканам — в область второго грудного сегмента. Фиксировали время гибели животных.

**Выделение компонентов яда *L. pallidus* с использованием ионообменной хроматографии.** Все хроматографические процедуры осуществляли с использованием жидкостной хроматографической системы FPLC (Pharmacia, Швеция). После каждой стадии разделения проводили тестирование токсической активности фракций и их электрофоретический анализ. Получение экстракта из 100 мг цельного яда *L. pallidus* и первую стадию его фракционирования на колонке Mono Q HR 5/5 проводили в градиенте концентрации от 0 до 1 М NaCl при рН 8.0, как описано ранее [9]. Фракцию, элюруемую на этой стадии разделения в области концентраций NaCl 200–310 мМ и обладающую токсичностью по отношению к насекомым, диализовали против 25 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (рН 6.3) и подвергали хроматографии в этом же буфере на колонке Mono Q HR 5/5 в градиенте концентрации NaCl от 0 до 0.4 М. Биологически активную фракцию, десорбируемую в этих условиях при 100–200 мМ NaCl, затем рехроматографировали последовательно на колонке Phenyl-Superose HR 5/5 в обратном градиенте концентрации сульфата аммония с последующей ионообменной хроматографией на Mono Q HR 5/5 в 25 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (рН 6.5) в градиенте концентрации NaCl, как в работе [9].

**Иммуноаффинное выделение токсина, специфичного для позвоночных,** из 30 мг яда *L. pallidus* на иммобилизованных моноклональных антителах A15 против  $\alpha$ -ЛТ проводили по методу [12]. В очищенном препарате тестировали биологическую активность и анализировали его электрофоретически.

**N-Концевую аминокислотную последовательность  $\alpha$ -ЛТ-р и  $\alpha$ -ЛИТ-р** определяли с помощью автоматической деградации в газофазном секвенаторе 470A (Applied Biosystems, США) из раствора, содержащего 50–150 пмоль белка, или после

электрофореза в SDS-ПААГ и электропереноса на иммобилон ТМ. В последнем случае перед секвенированием белковую зону, соответствующую искомому белку, окрашивали 0.1% кумасси и вырезали.

**Триптический гидролиз  $\alpha$ -ЛТ-р.** 6 нмоль  $\alpha$ -ЛТ-р после восстановления дисульфидных связей с помощью дитиотреита и карбоксиметилирования по методу [17] подвергали гидролизу трипсином при соотношении белок-фермент 40 : 1, ферментативную реакцию проводили в 50 мМ трис-НСl (рН 7.5) при 37°C в течение 16 ч.

**Пептиды** триптического гидролизата  $\alpha$ -ЛТ-р фракционировали с помощью ВЭЖХ на обращенно-фазной колонке Ultrasphere ODS, 5 мкм (250 × 2 мм) в 0.1% TFA в градиенте концентрации ацетонитрила (рис. 4). Рехроматографию отдельных фракций осуществляли ВЭЖХ на той же колонке в 10 мМ аммоний-ацетатном буфере (рН 5.7) в градиенте концентрации ацетонитрила. Гомогенные пептидные фрагменты подвергали автоматической деградации.

Авторы выражают благодарность В.Н. Пашкову (ФИБХ) за любезно предоставленный иммуноаффинный сорбент, а также Ю.Ф. Леоновой и Т.В. Овчинниковой (ИБХ РАН) за секвенирование белков и пептидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grasso A. // Neurotoxins Neurochemistry / Ed. J.O. Dolly. London: Ellis Horwood, 1988. P. 67-78.  
 2. Meldolesi J., Scheer H., Madeddu L., Wanke E. // Trends Pharmacol. Sci. 1986. V. 7. P. 151-155.

3. Kiyatkin N.I., Dulubova I.E., Chekhovskaya I.A., Grishin E.V. // FEBS Lett. 1990. V. 270. P. 127-131.  
 4. Kiyatkin N.I., Dulubova I.E., Grishin E.V. // Eur. J. Biochem. 1993. V. 213. P. 121-127.  
 5. Dulubova I.E., Krasnoperov V.G., Khvotchev M.V., Pluzhnikov K.A., Volkova T.M., Grishin E.V., Vais H., Bell D.R., Usherwood P.N.R. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 7535-7543.  
 6. Красноперов В.Г., Шамотиенко О.Г., Гришин Е.В. // Биооргани. химия. 1990. Т. 16. С. 1138-1140.  
 7. Красноперов В.Г., Шамотиенко О.Г., Гришин Е.В. // Биооргани. химия. 1990. Т. 16. С. 1567-1569.  
 8. Ушкарев Ю.А., Гришин Е.В. // Биооргани. химия. 1986. Т. 12. С. 71-80.  
 9. Ковалевская Г.И., Пашков В.Н., Булгаков О.В., Федорова И.М., Магазаник Л.Г., Гришин Е.В. // Биооргани. химия. 1990. Т. 16. С. 1013-1018.  
 10. Engvall E. // Meth. Enzymol. 1980. V. 70. P. 419-439.  
 11. Пашков В.Н., Ковалевская Г.И., Грико Н.Б., Булгаков О.В., Яхнина Е.Б., Николишина Е.В., Сторчак Л.Г., Шатурский О.Я., Гиммельрейх Н.Г., Гришин Е.В. // Биооргани. химия. 1992. Т. 18. С. 383-389.  
 12. Пашков В.Н., Ковалевская Г.И., Красноперов В.Г., Булгаков О.В. // Биооргани. химия. 1989. Т. 15. С. 1281-1283.  
 13. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265-275.  
 14. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680-685.  
 15. Левина Н.Б., Слепак В.З., Киселев О.Г., Шемякин В.В., Хохлачев А.А. // Биооргани. химия. 1989. Т. 15. С. 24-31.  
 16. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 4350-4354.  
 17. Волкова Т.М., Галкина Т.Г., Куделин А.Б., Гришин Е.В. // Биооргани. химия. 1991. Т. 17. С. 437-441.

Main Toxic Components from *Latrodectus pallidus* Venom: Isolation and Partial Structural Characterization

A. R. Charaja\*\*, L. V. Shevchenko\*, A. K. Molodkin\*\*, K. A. Pluzhnikov\*, T. M. Volkova\*, and E. V. Grishin\*

\* Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

\*\* Russian University of Peoples' Friendship, ul. Miklukho-Maklaya 6, Moscow, 117198 Russia

**Abstract**—Toxic components of the *Latrodectus pallidus* spider venom were isolated and characterized. The venom was shown to contain a toxin specific for mammals and at least one insectospecific toxin. Partial amino acid sequences of both toxins were determined, and their high structural homology with previously studied  $\alpha$ -latrotoxin and  $\alpha$ -latroinsectotoxin from *L. mactans tredecimguttatus* was found.

*Key words:* neurotoxin, *Latrodectus*, primary structure.