



УДК 598.126–114.52.088.5: 577.112:543.51

## MALDI-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ НОВЫХ БЕЛКОВ В ЯДЕ ЗМЕЙ

© 2000 г. В. В. Кухтина, К. Вайзе\*, А. В. Осипов, В. Г. Старков, М. И. Титов, С. Е. Есипов, Т. В. Овчинникова, В. И. Цетлин, Ю. Н. Уткин<sup>#</sup>

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

\*Институт химии и биохимии Свободного университета Берлина, Берлин, Германия

Поступила в редакцию 13.06.2000 г. Принята к печати 13.07.2000 г.

С применением метода MALDI-масс-спектрометрии предпринят поиск новых полипептидных соединений, содержащихся в яде кобр в незначительных количествах. Охарактеризован ряд новых белков с молекулярной массой 7–25 кДа, типичной для известных белковых токсинов змей; при этом содержание одного из полипептидов не превышало 0.02% веса сухого яда.

*Ключевые слова:* яд кобры; полипептидные токсины; белки; MALDI-масс-спектрометрия.

### ВВЕДЕНИЕ

Хорошо известно, что белковые токсины сыграли важную роль при изучении холинорецепторов. Так,  $\alpha$ -бунгаротоксин из яда крайты *Bungarus multicinctus* был использован при идентификации и выделении никотинового холинорецептора *Torpedo*, мышечных никотиновых холинорецепторов и нейронального рецептора  $\alpha 7$  [1].  $\kappa$ -Бунгаротоксины, присутствующие в яде в значительно меньших количествах (0.1%), представляют собой незаменимый инструмент для изучения нейрональных рецепторов [2].

Известные  $\kappa$ -бунгаротоксины [3, 4] взаимодействуют с нейрональными холинорецепторами никотинового типа определенных подтипов (в частности,  $\alpha 3/\beta 2$ ) и широко используются для их исследования. Селективные лиганды других подтипов нейрональных никотиновых холинорецепторов до сих пор не обнаружены.

Вместе с тем, в яде мамб было идентифицировано несколько полипептидных токсинов, взаимодействующих с мускариновыми ацетилхолиновыми рецепторами различных подтипов (m1–m5), но без абсолютной специфичности [5, 6].

Поскольку мамбы, крайты и кобры принадлежат к одному семейству (Elapidae), вполне вероятно, что  $\kappa$ -бунгаротоксины и мускариновые токсины или их аналоги содержатся в ядах всех змей этого семейства, но в разных соотношениях. Эти яды имеют много общего: они высокотоксичны, обладают ярко выраженными нейротоксическими

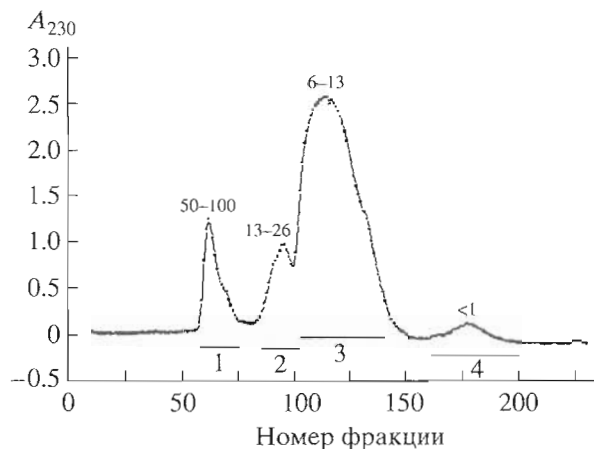
свойствами и содержат ряд одинаковых компонентов, в частности, нейротоксины постсинаптического действия, играющие роль конкурентных антагонистов никотинового холинорецептора, и гомологи ингибитора трипсина, блокирующие калиевые каналы.

Следует отметить, что в последнее время с применением методов генной инженерии идентифицировано большое количество белков, представляющих собой новые типы и подтипы рецепторов и ионных каналов (см., например, [7, 8]). Однако их функциональная характеристика зачастую затруднена отсутствием специфических лигандов.

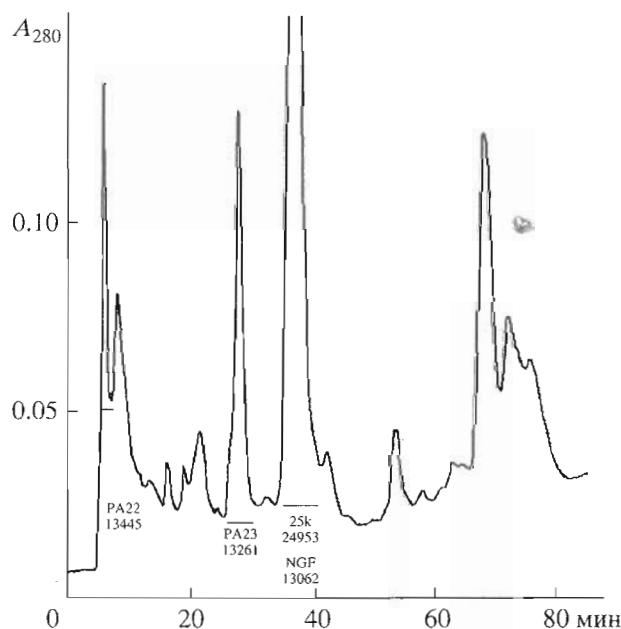
В свете этого кажется весьма актуальным выделение из ядов змей новых полипептидных соединений, которые могут оказаться селективными и специфическими лигандами рецепторов и ионных каналов различных типов и семейств. В яде конкретного вида содержание отдельных компонентов порой не превышает долей процента, вследствие чего они не были обнаружены ранее. В настоящее время работа с такими минорными компонентами стала возможной благодаря развитию эффективных методов разделения белков (ВЭЖХ) и их анализа (MALDI-масс-спектрометрия). Высокая чувствительность MALDI-масс-спектрометрии позволяет обнаруживать минорные компоненты сложных белковых смесей и устанавливать молекулярные массы этих белков на всех этапах их выделения и очистки.

Цель нашей работы – идентификация и выделение ранее неизвестных белковых токсинов из яда кобры *Naja kaouthia*, которые могли бы в

Сокращения: MALDI – matrix-assisted laser desorption ionization.  
<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 330-73-74; факс: (095) 335-57-33; e-mail: utkin@ibch.ru).



**Рис. 1.** Разделение компонентов цельного яда гель-фильтрацией на сефадексе G-50sf. Отмечены собранные фракции. Условия см. “Эксперимент. часть”. Числа над пиками соответствуют молекулярным массам (кДа).



**Рис. 2.** Разделение компонентов фракции 2, рис. 1 ионообменной хроматографией на колонке НЕМА ВЮ 1000 СМ. Состав фракций см. текст, условия – “Эксперимент. часть”. Числа у обозначения пиков – молекулярные массы (Да) (здесь и на рис. 3, 4).

дальнейшем послужить инструментами при исследовании рецепторов различных типов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нейрональные бунгаротоксины и мускариновые токсины имеют молекулярные массы в интервале 7200–7700 Да, что отличает их от основных компонентов яда кобр: цитотоксинов ( $M < 7000$  Да), “коротких” ( $M < 7000$  Да) и “длинных”

( $M > 7800$  Да) нейротоксинов. С учетом этой характеристики интересующих нас соединений мы и проводили фракционирование ядов. Кроме того, поскольку как высокомолекулярные ( $M 10\text{--}30$  кДа), так и низкомолекулярные ( $M < 1000$  Да) компоненты яда кобр малоизучены, мы исследовали также и эти компоненты.

Поскольку мы ориентировались на молекулярные массы соединений, в качестве первого этапа разделения яда использовалась гель-фильтрация. В результате гель-фильтрации яда кобры *Naja kaouthia* на колонке с сефадексом G-50sf нами были получены четыре фракции (рис. 1). Фракция 1 содержала высокомолекулярные компоненты ( $M 50\text{--}100$  кДа) и ее состав не исследовался, а фракции 2, 3 и 4 подвергались дальнейшему разделению и подробному анализу состава.

Фракция 2 (рис. 1), содержащая соединения с  $M 13\text{--}26$  кДа, хроматографировалась на катионообменной колонке НЕМА ВЮ 1000СМ (рис. 2). Анализ полученных фракций методом MALDI-масс-спектрометрии позволил наряду с известными соединениями (фосфолипаза PA22,  $M 13445$  Да; фосфолипаза PA23,  $M 13261$  Да; фактор роста нервов NGF,  $M 13062$  Да) идентифицировать новый белок с молекулярной массой 24953 Да, который мы обозначили как 25k. Еще один белок с  $M 12042$  Да (12k) был обнаружен при хроматографировании фракции 3 в тех же условиях (рис. 3).

Поиск в базах данных белковых последовательностей SWISS PROT и TrEMBL слабоосновных белков ( $pI 7 \pm 1$ ) с  $M 12000 \pm 1200$  Да, идентифицированных в ядах змей, не выявил соединений с молекулярными массами в области 12 кДа. Обнаруженные белки относились в основном к фосфолипазам A.2 ( $M 13300 \pm 100$  Да) и факторам роста нервов ( $M 13000\text{--}13100$  Да). Аналогичный поиск белков с  $M 25000 \pm 2500$  Да показал, что подобные соединения в ядах кобр не охарактеризованы.

С целью исследовать белки 12k и 25k более подробно был проведен анализ их N-концевых аминокислотных последовательностей. Для белка 12k была определена последовательность 24 а. о., а для белка 25k – 25 а. о. Поиск гомологичных последовательностей в банках данных SWISS PROT и TrEMBL с использованием программы BLAST [9, 10] не выявил для белка 12k сколько-нибудь значимого сходства с известными аминокислотными последовательностями. Аналогичный поиск для белка 25k показал наличие подобия с белком TPX1 мыши, принадлежащим к семейству секреторных белков: с высоким содержанием остатков Cys (CRISP, cysteine-rich secretory proteins). Подобные компоненты в ядах змей ранее идентифицированы не были.

Белки 25k и 12k сравнительно легко отделялись от основных токсических компонентов яда с помощью ионообменной хроматографии. Значи-

тельно более сложной представлялась идентификация новых полипептидов с  $M$  7200–7700 Да, поскольку эти соединения имеют весьма близкие свойства (масса, гидрофобность, распределение заряженных остатков) с основными токсическими компонентами яда (постсинаптические нейротоксины и цитотоксины). Именно для решения этой задачи фракцию, содержащую основные токсические компоненты (фракция 3, рис. 1), разделяли с помощью высокоэффективной ионообменной хроматографии с использованием широкого диапазона молярности (5 мМ – 1 М) элюирующего буфера (рис. 3). Полученные таким образом фракции анализировали с помощью MALDI-масс-спектрометрии. При этом наряду с известными соединениями ( $\alpha$ -кобратоксин NXL1,  $M$  7831 Да; “короткий” нейротоксин NXS1,  $M$  6982 Да; цитотоксины 5, 3 и 2 CX5, CX3 и CX2,  $M$  6654, 6717 и 6745 Да) были обнаружены также неизвестные ранее полипептиды (12k, MTLP-3, MTLP-1, WTX), имеющие молекулярные массы в интересующем нас диапазоне (рис. 3).

Эти соединения подвергали дополнительной очистке с помощью обращенно-фазовой хроматографии, определяли молекулярные массы полипептидов с помощью MALDI-масс-спектрометрии и затем анализировали их  $N$ -концевые аминокислотные последовательности. Сравнение полученных данных с известными структурами компонентов яда змей показало, что аминокислотная последовательность ранее неизвестного компонента MTLP-3 с  $M$  7615 Да имеет высокую степень соответствия с первичной структурой белка Q9W727 из яда *B. multicinctus*, выведенной из последовательности кДНК его предшественника. Новый белок MTLP-1 с  $M$  7361 Да по  $N$ -концевой последовательности наиболее близок семейству мускариновых токсинов, идентифицированных ранее в ядах мамб [5, 6]. Последовательность же белка WTX с  $M$  7613 Да соответствует последовательности “слабого токсина” SM-9a,  $M$  7482 Да [11], названного “слабым” из-за его низкой токсичности. Однако молекулярная масса белка WTX на 131 Да превышает массу токсина SM-9a и, как показало дальнейшее установление полной аминокислотной последовательности [12], этот белок содержит остаток триптофана и представляет собой первый триптофансодержащий “слабый токсин”.

Таким образом, использование MALDI-масс-спектрометрии для обнаружения полипептидных токсинов позволило выделить пять новых белков из сложной смеси компонентов. При этом содержание новых токсинов в яде различается весьма существенно: от 5–6% (WTX) до <0.02% (MTLP-3) (табл. 1).

Возможности MALDI-масс-спектрометрии не ограничиваются анализом соединений полипеп-

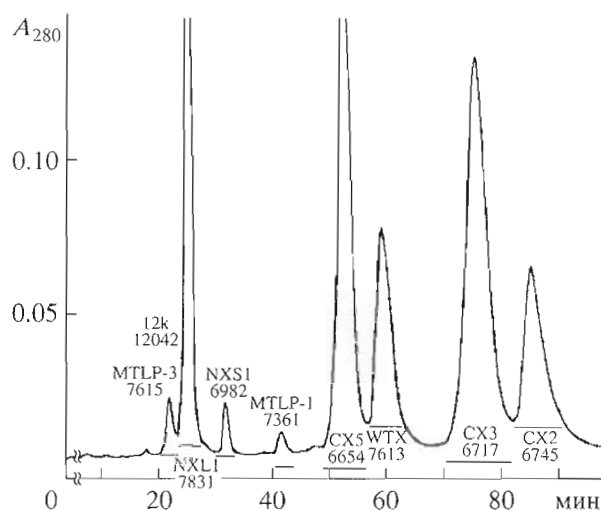


Рис. 3. Разделение компонентов фракции 3, рис. 1 ионообменной хроматографией на колонке НЕМА ВЮ 1000СМ. Состав фракций см. текст, условия – “Эксперимент. часть”.

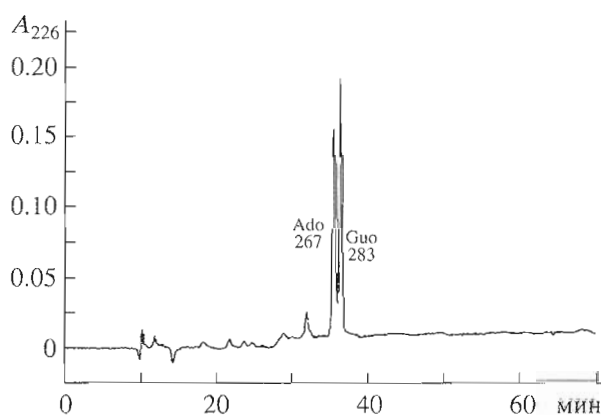


Рис. 4. Разделение компонентов фракции 4, рис. 1 обращенно-фазовой хроматографией на колонке ТSK ODS-120Т. Условия см. “Эксперимент. часть”.

тидной и белковой природы. Анализ фракции 4 (рис. 1) с использованием этого метода позволил обнаружить присутствие в ней соединений с  $M$  200–300 Да. Эту фракцию разделяли с помощью обращенно-фазовой хроматографии (рис. 4),

Таблица 1. Содержание обнаруженных полипептидов в яде *Naja kaouthia*

Название белка	Содержание в яде, %	$M$ , Да
25k	~0.5	24953
12k	~0.1	12042
MTLP-3	~<0.02	7615
MTLP-1	~0.2	7361
WTX	~5.0–6.0	7613

**Таблица 2.** Идентификация компонентов фракции 4 (рис. 4) методами УФ-спектроскопии и MALDI-масс-спектрометрии

Компонент фракции	Молекулярная масса, Да		Спектральные данные				
	теоретическая	измеренная [M + H] <sup>+</sup>	рН	A <sub>250</sub> /A <sub>260</sub>		A <sub>280</sub> /A <sub>260</sub>	
				литературные [17]	измеренные	литературные [17]	измеренные
Аденозин	267.2	268	1	0.84	1.00	0.22	0.20
			6	0.78	0.98	0.14	0.18
			11	0.79	0.88	0.15	0.19
Гуанозин	283.2	284	0.7	0.94	0.98	0.70	0.66
			6	1.15	1.18	0.67	0.66
			11.3	0.89	0.90	0.61	0.55

и полученные продукты анализировали методом MALDI-масс-спектрометрии и УФ-спектроскопии (табл. 2). Данные, приведенные в табл. 2, позволили однозначно идентифицировать основные продукты как аденозин и гуанозин. Компоненты нуклеиновых кислот были идентифицированы ранее в яде кобры *Naja naja atra* [13] и крайта *V. multincinctus* [14, 15].

Таким образом, метод MALDI-масс-спектрометрии позволяет осуществлять в многокомпонентных смесях целенаправленный поиск и последующую идентификацию соединений с молекулярными массами в заданной области, при этом диапазон масс может составлять от сотен до десятков тысяч дальтон.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали ацетонитрил (Janssen Chimica), трифторуксусную кислоту (Merck), водный раствор аммиака (Химмед), уксусную кислоту (Химмед).

Для получения яда змей *N. kaouthia* держали в неволе при 25–26°C и кормили крысами и мышами. Змей доили ручным массажем желез, полученный яд высушивали над хлоридом кальция и хранили при –20°C.

**Разделение яда.** Яд (200–300 мг) фракционировали на колонке (2.5 × 90 см) с сефадексом G-50sf (Pharmacia) в 0.1 М аммоний-ацетатном буфере, рН 6.2, при скорости потока 10 мл/ч. Полученные фракции лиофилизовали и затем разделяли на колонке НЕМА ВЮ 1000СМ (8 × 250 мм, Tessek) в линейном градиенте концентрации аммоний-ацетатного буфера, рН 7.5 (5 мМ → 1 М за 100 мин) при скорости потока 1.4 мл/мин или на колонке TSK ODS-120Т (7.8 × 300 мм, LKB) в градиенте концентрации ацетонитрила в воде (2 → 22% за 20 мин) в присутствии 0.1% трифторуксусной кислоты при скорости потока 1 мл/мин.

**MALDI-масс-спектрометрия.** Полученные фракции были лиофилизованы, затем растворены в воде в концентрации 10<sup>-4</sup>–10<sup>-5</sup> М. Молекулярные массы выделенных соединений определяли на времяпролетном масс-спектрометре Vision 2000 (ThermoBioAnalysis, США), оборудованном источником ионов с матрично-стимулированной лазерной десорбцией и ионизацией (Matrix-assisted Laser Desorption Ionization). При нанесении образца на мишень использовали метод высушенной капли [16], в качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксibenзойную кислоту (Sigma). Образец на мишени облучали ультрафиолетовым лазером с λ 337 нм и максимальной мощностью энергии в импульсе 250 мкДж. Регистрировали положительно заряженные ионы в режиме отражения.

**Анализ N-концевой аминокислотной последовательности.** Выделенные белки подвергали деградации по методу Эдмана с использованием автоматических секвенаторов 473А или 470 (Applied Biosystems, США). При использовании секвенатора 470 идентификацию фенилтиогидантоиновых (РТН) производных аминокислот осуществляли с помощью РТН-анализатора 120А (Applied Biosystems).

Частично работа выполнена в лаборатории проф. Ф. Хухо (Институт химии и биохимии Свободного университета Берлина), за что авторы выражают ему глубокую благодарность. Авторы выражают также благодарность докт. П. Франке (Свободный университет Берлина) за помощь в определении молекулярных масс некоторых белков.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tsetlin V. // Eur. J. Biochem. 1999. V. 264. P. 281–286.
2. Grant G.A., Luetje C.W., Summers R., Xu X.L. // Biochemistry. 1998. V. 37. P. 12166–12171.
3. Loring R.H. // J. Toxicol.-Toxin Reviews. 1993. V. 12. P. 105–153.

4. Chiappinelli V.A., Weaver W.R., McLane K.E., Conti-Fine B.M., Fiordalisi J.J., Grant G.A. // *Toxicon*. 1996. V. 34. P. 1243–1256.
5. Jerusalinsky D., Kornisiuk E., Alfaro P., Quillfeldt J., Ferreira A., Rial V.E., Duran R., Cervenansky C. // *Toxicon*. 2000. V. 38. P. 747–761.
6. Liang J.S., Carsi-Gabrenas J., Krajewski J.L., McCafferty J.M., Purkerson S.L., Santiago M.P., Strauss W.L., Valentine H.H., Potter L.T. // *Toxicon*. 1996. V. 34. P. 1257–1267.
7. Changeux J.-P., Edelstein S.J. // *Neuron*. 1998. V. 21. P. 959–980.
8. Jan L.Y., Jan Y.N. // *Annu. Rev. Neurosci.* 1997. V. 20. P. 91–123.
9. Altschul S.F., Gish W. // *Methods in Enzymology* / Ed. R. Doolittle. 1996. V. 266. P. 460–480.
10. Altschul S.F., Madden T., Schaffer A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. // *Nucl. Acids Res.* 1997. V. 25. P. 3389–3402.
11. Joubert F.J., Taljaard N. // *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 1980. V. 361. P. 425–436.
12. Utkin Yu.N., Kukhtina V.V., Maslennikov I.V., Eletsky A.V., Starkov V.G., Weise C., Franke P., Hucho F., Tsetlin V.I. // *Toxicon*. 2000. (в печати).
13. Tu A.T. *Venoms: Chemistry and Molecular Biology*. New York; London; Sydney; Toronto: John Wiley and Sons Inc., 1977.
14. Wei A.L., Lee C.Y. // *Toxicon*. 1965. V. 3. P. 1–4.
15. Lee C.Y., Chang S.L., Kau S.T., Luh S.-H. // *J. Chromatogr.* 1972. V. 72. P. 71–82.
16. Kussmann M., Nordhoff E. // *J. Mass-Spec.* 1997. V. 32. P. 593–601.
17. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. // *Справочник биохимика: Пер. с англ. М.: Мир, 1991.*

## The MALDI Mass Spectrometry in the Identification of New Proteins in Snake Venoms

V. V. Kukhtina\*, C. Weise\*\*, A. V. Osipov\*, V. G. Starkov\*, M. I. Titov\*, S. E. Esipov\*, T. V. Ovchinnikova\*, V. I. Tsetlin\*, and Yu. N. Utkin\*\*

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

\*\*Institute of Chemistry and Biochemistry, Free University of Berlin, Berlin, Germany

By MALDI MS, we searched cobra venoms for new low-content polypeptides. A number of new proteins with molecular masses 7–25 kDa, characteristic of the known snake protein toxins, were identified, with the content of one of them less than 0.02%.

*Key words:* cobra venom, MALDI mass spectrometry, polypeptide toxins, proteins

# To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 330-7374; fax: +7 (095) 335-5733; e-mail: utkin@ibch.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 11. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.