

Zur Biochemie des Giftes von *Cupiennius salei* (Ctenidae)

par
Lucia Kuhn-Nentwig & Wolfgang Nentwig

Summary: By a HPLC purification sequence, one toxin from the venom of the ctenid spider *Cupiennius salei* could be isolated. The *Cupiennius salei* toxin (CSTX) has a molecular weight about 12 kD and causes a high mortality in a *Protophormia* biotest.

1. EINFÜHRUNG

Biochemische Untersuchungen an Spinnengift haben sich ursprünglich wegen der leichten Gewinnbarkeit des Giftes auf Theraphosiden und aus medizinischen Gründen auf humantoxische Arten beschränkt. In den letzten 10 Jahren stehen v.a. Araneiden und Tetragnathiden im Vordergrund des Interesses, da ihre toxischen Polyamine für neurophysiologische Untersuchungen von besonderem Interesse sind. Über das Gift der Spinnenart, die heute vermutlich am besten untersucht ist, die Ctenide *Cupiennius salei*, ist jedoch nichts bekannt. Wir haben uns daher dieser Art zugewandt und berichten hier über erste Ergebnisse.

2. MATERIAL UND METHODE

Giftgewinnung. *Cupiennus salei* wird bei uns in einer Dauerzucht gehalten (MALLI & NENTWIG, dieser Band). Adulten, weiblichen Tieren wurde in zweiwöchigen Intervallen Gift entnommen. Hierzu wurde es nach elektrischer Reizung in Mikrokapillaren aufgefangen, gepoolt und bei -80°C gelagert.

Biotest. Um einzelne Giftfraktionen auf ihre Toxizität zu überprüfen, wurden jeweils

Aliquots in 60 mM Natriumacetat (pH 5) oder in Insektenringer in das Coxalgenk II der Fliege *Protophormia* sp. (Calliphoridae) eingespritzt (0.3 µl). Als Kontrolle dienten Injektionen nur mit Insektenringer bzw. Puffer.

Elektrophorese. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde mit dem Phastsystem (Pharmacia) durchgeführt. Die Geldimension betrug 43 x 50 mm. Das Puffersystem wurde nach LAEMMLI (1970) wie folgt modifiziert: Sammelgel: 7.5% Acryl-/Bisacrylamid (29.1:0.9); 125 mM Tris Cl (pH 6.8); 40% Glycerin; 0.05% SDS. Trenngel: 20% Acryl-/Bisacrylamid (29.1:0.9); 375 mM Tris Cl (pH 8.8); 8 M Urea; 5% Glycerin; 0.05% SDS. Die Trenngelstrecke betrug 37 mm. Zusammensetzung der Pufferstreifen: 0.2 M Tricine; 0.2 M Tris (pH 8.1); 0.55% SDS; 3% Agarose IEF. Die Silberanfärbung erfolgte nach Angaben von Pharmacia (Phastsystem: D.t.file Nr.210).

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) erfolgte mit dem Phastsystem und käuflichen Polyacrylamidgelen (PhastGel IEF 3-9). Die Feldstärke betrug 500 Volt/cm, die Dauer 30 Minuten. Die Silberanfärbung erfolgte wie oben beschrieben.

Reinigung des Toxins. Es wurden jeweils 110 µl Spinnengift 10 Minuten bei 14'000 UPM zentrifugiert und der Überstand mit 60 mM Natriumacetat (pH 5.0) 1:1 verdünnt und auf eine Gelfiltrationssäule (Superdex 75, HR 10/30 Pharmacia; Flow 0.2 ml/min; HPLC-System Pharmacia) aufgetragen. Fraktionen, welche im Biotest Toxizität aufwiesen, wurden einzeln weiterverarbeitet. Sie wurden 1:1 mit A. bidest verdünnt und mit einer Mono S (HR 5/5 Pharmacia; Laufmittel A: 30 mM Natriumacetat (pH 5.0); B: 30 mM Natriumacetat (pH 5.0), 2 M NaCl, Flow 0.25 ml/min) einer Kationenaustauscherchromatographie unterzogen. Die erhaltenen Fraktionen wurden auf ein kleines Volumen eingengt (1-2 ml) und einer reversed phase-Chromatographie unterzogen (Nucleosil C4; Laufmittel A: 0.1% Trifluoressigsäure in A. bidest.; B: 99.9% Acetonitril, 0.1% Trifluoressigsäure, Flow 1 ml/min). Das erhaltene Toxin wurde mit SDS-Polyacryl-Gelelektrophorese sowie mit IEF auf seine Reinheit hin überprüft.

pH- und Ionenbestimmung. Der pH-Wert des Giftes wurde mit Merck pH Teststäbchen Nr. 9542 bestimmt. Die Natrium-, Kalium- und Calciumkonzentration wurde mit einem Atomabsorptionsspektrometer (Beckmann 1248) gemessen.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Das gemolkene Gift adulter, weiblicher Spinnen weist einen Proteingehalt von 130-150 µg/µl auf. Der pH-Wert liegt bei 6.1. Für Natrium wurde eine Ionenkonzentration von 8.9 mM, für Kalium von 215.1 mM und für Calcium von 0.94 mM gemessen.

Die Anzahl der einzelnen Proteine lässt sich im SDS-Polyacrylamidgel (Abbildung 1) schlecht ermitteln, da es einige wenige, in geringer Konzentration vorkommende Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 31-100 kD und 6 stark angefärbte Hauptproteinbanden im Bereich von 2'500-31'000 D aufweist. In Abb. 3 zeigt das IEF-Gel (pH-Bereich 3 - 5) im basischen Bereich drei stark angefärbte Proteinbanden (pI

8,2, 8,3 und ca. 9,3) sowie ca. 6 schwach angefärbte Banden (pI zwischen 7 und 9,3). Die Mehrzahl der Proteine (5 stark angefärbte sowie 7 schwach angefärbte Banden) haben einen pI, der im sauren pH-Bereich zwischen pH 4,7 und 6,8 liegt.

Nach einer Gelfiltration (Abbildung 1) wurden 5 Fraktionen (Nr. 15-19) mit letaler Wirkung im Protophormia-Biotest im Bereich von 6-14 kD identifiziert. Bei den übrigen Fraktionen liess sich in den vorhandenen Konzentrationen keine Toxizität nachweisen. Fraktion 1-10 und 25-41 zeigen zum Teil eine starke Absorption bei 215 nm auf, lassen sich aber nicht als Proteine im SDS-Acrylamidgel mit Silberanfärbung nachweisen.

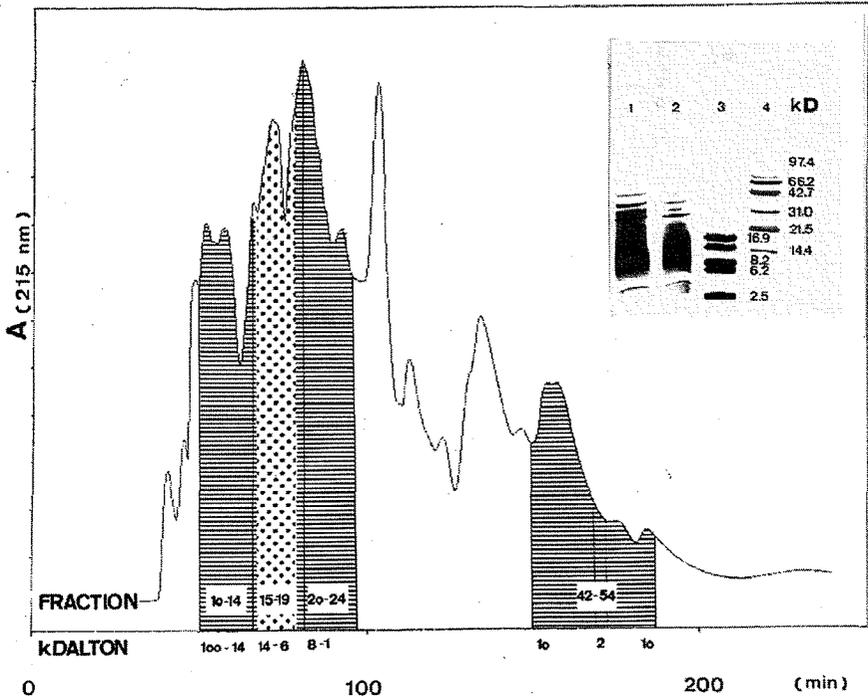


Abb.1. Gelfiltration des nativen Giftes von *Cupiennius salei* (Superdex 75, Pharmacia) Proteinfractionen sind schraffiert, im Biotest als toxisch erkannte Fraktionen sind punktiert. Polyacrylamidgel: Spur 1 und 2 natives Gift (1:20 und 1:50); Spur 3 und 4 Molekulargewichtsmarker (Pharmacia und Biorad).

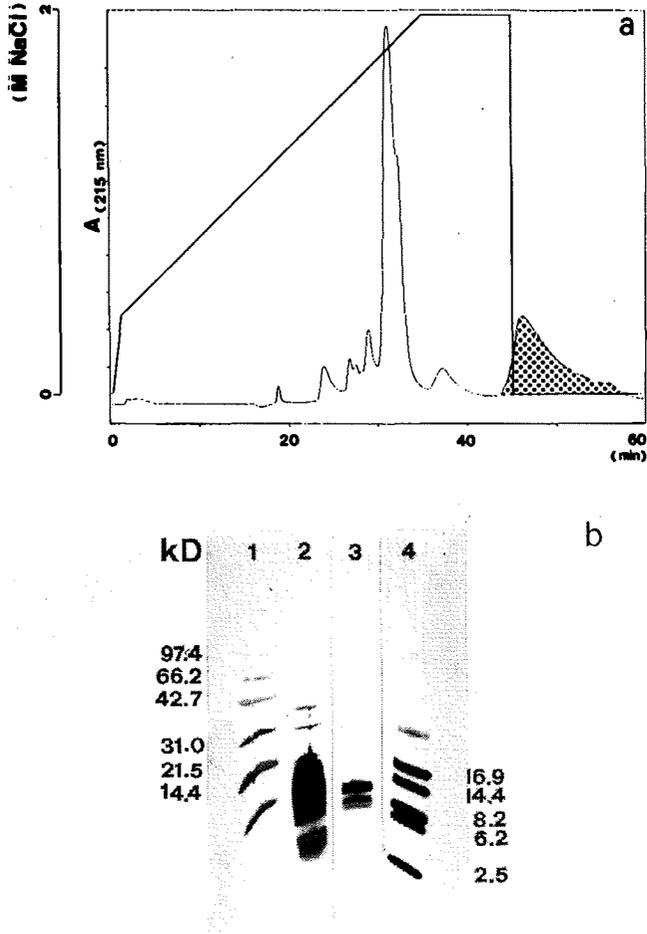


Abb. 2. Weitere Auftrennung der in Abb. 1 punktierten, toxischen Fraktionen. a: Kationenaustauscher-Chromatographie (Mono S, Pharmacia), punktiert ist die toxische Fraktion. b: SDS-Polyacrylamidgel: Spur 1 und 4 Molekulargewichtsmarker; Spur 2 natives Gift (1:20); Spur 3 durch Gelfiltration aufgetrennte Fraktion 16.

In einem nächsten Schritt wurden die Fraktionen mit der stärksten Giftwirkung (16-18) jeweils separat in einer Kationenaustauscherchromatographie aufgetrennt (Abbildung 2). Bei Fraktion 16, 17 und 18 zeigte jeweils nur der letzte Peak (punktiert) eine toxische Wirkung im Biotest. Die anderen Peaks sind, soweit durchgetestet, in diesen Konzentrationen nicht toxisch. Bei Fraktion 18 wurde bisher nur der markierte Peak untersucht und als toxisch identifiziert.

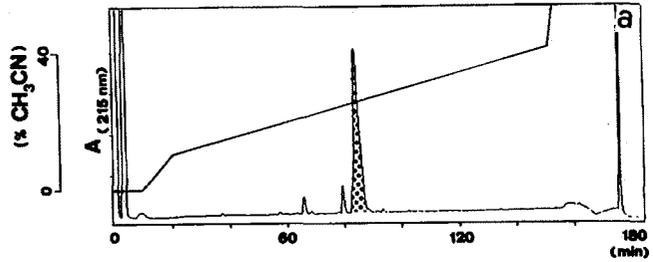
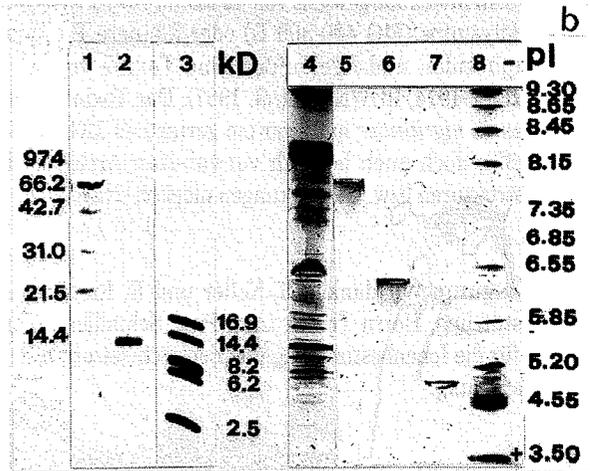


Abb. 3a: reversed Phase Chromatographie (Nucleosil C4 300, Machery und Nagel) der punktierten toxischen Fraktion von Abb. 2a. Die im Biotest als toxisch erkannte Fraktion ist punktiert. b: SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese Spur 1 und 3 Molekulargewichtsmarker; Spur 2 gereinigtes CSTX; IEF-Gel Spur 4 natives Gift (1:15); Spur 5, 6, und 7 gereinigtes CSTX jeweils in der Nähe von Kathode, Anode bzw. der Mitte aufgetragen; Spur 8 pI-Standards (pH 3-9, Pharmacia).



Nach einer weiteren Reinigung der markierten Peaks von Fraktion 16-18 mit reversed phase HPLC (Abbildung 3) sowie der nicht markierten weiteren Peaks von Fraktion 16 und 17 zeigten wiederum nur die gekennzeichneten Fraktionen eine sofortige letale Giftwirkung im Biotest. Im SDS-Polyacrylamidgel erwiesen sich die drei markierten Einzelpicks nach reversed phase HPLC als ein einheitliches Protein (Abbildung 3b) von ca. 12 kD.

Dieses Protein stellt somit das erste bisher bekannte Toxin von *Cupiennius salei* dar (CSTX). Es weist in Abwesenheit bzw. Gegenwart von β -Mercaptoethanol keinen Unterschied im Molekulargewicht auf, besteht also nicht aus entsprechend auftrennbaren Untereinheiten. Das geschätzte Molekulargewicht im SDS-Polyacrylamidgel liegt bei 12 kD. Dies entspricht einer Grösse von ca. 100 Aminosäuren.

Bisher sind Versuche, CSTX in einer 2D-Elektrophorese auf seine Reinheit hin weiter zu überprüfen, fehlgeschlagen, da es sich im IEF-Gel als sehr schwer löslich zeigt. An verschiedenen Bereichen (Kathode, Mitte und Anode) des IEF-Gels aufgetragen (Abbildung 3b), zeigt es ein Wanderverhalten zum sauren pH-Bereich hin. Wird das

Protein direkt im sauren pH-Bereich aufgetragen, ist es gänzlich unlöslich und verbleibt am Auftragungsort.

Diese Ergebnisse sind in mehrfacher Hinsicht bemerkenswert. Zum einen gelang es uns bisher, nur ein Toxin im Gift von *Cupiennius salei* zu identifizieren. In den meisten der wenigen bisher untersuchten Spinnengiften wurden jedoch mehrere Toxine nachgewiesen (z.B. ADAMS et al. 1989), die ontogenetische Veränderungen (MALLI & NENTWIG, dieser Band) oder beutetierspezifische Giftwirkungen (STUDER & NENTWIG, dieser Band) erklären können. Es kann also erwartet werden, dass noch weitere Toxine im Gift von *Cupiennius salei* gefunden werden. Zum anderen fällt CSTX durch sein Molekulargewicht von 12 kD im SDS-PAGE auf. Die meisten Spinnentoxine sind Polyamine (MG 400-800 D) oder kleinere Proteine von 4-6 kD. Lediglich von Theraphosiden und Ageleniden sind Toxine von bis zu 13 und 16 kD bekannt (PERRETT 1974, BOWERS et al. 1987). Das Toxin der einzigen untersuchten Ctenide *Phoneutria nigriventer* hat zwar ein geringeres MG von 5500-5900 D (ENTWISTLE et al. 1982), doch auch bei nah verwandten Arten sind deutlich unterschiedliche Toxinstrukturen bzw. Giftwirkungen möglich (NENTWIG et al. in press).

Danksagung: Wir danken S. Keller und R. Riechsteiner für vielfältige technische Unterstützung, Herrn Trusch (Abt. Prof. Schindler, Chemische Institute, Universität Bern) für die Ionenbestimmung und dem Schweizerischen Nationalfonds für finanzielle Unterstützung.

LITERATUR

- ADAMS, M.E., HEROLD, E.E., VENEMA, V.J. - (1989). Two classes of channel-specific toxins from funnel web spider venom. *J. Comp. Physiol. A*, 164: 333-342.
- BOWERS, C.W., PHILLIPS, H.P., LEE, P., JAN, Y.N., JAN, L.Y. - (1987). Identification and purification of an irreversible presynaptic neurotoxin from the venom of the spider *Hololena curta*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 3506-3510.
- ENTWISTLE, I.D., JOHNSTONE, R.A.W., MEDZIHRADSKY, D., MAY, T.T. - (1982). Isolation of a pure toxic polypeptide from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer* and its neurophysiological activity on an insect femur preparation, *Toxicon*, 20: 1059-1067.
- LAEMMLI, U.K. - (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227: 680-685.
- NENTWIG, W., FRIEDEL, T., MANHART, C. - (in press). Comparative investigations on the effect of the venoms of 18 spider species onto the cockroach *Blatta orientalis* (Blattodea). *Zool. Jb. (Allg. Zool., Physiol.)*.
- PERRETT, B.A. - (1974). The venom of the East African spider *Pterinochilus* sp.. *Toxicon*, 1974: 303-310.