

УДК 577.2

Рекомбинантная продукция, видоспецифическая активность на канале TRPA1 и важная роль N-концевого остатка токсина ProTx-I из яда тарантула *Thrixopelma pruriens*

М. А. Шулепко¹, М. Джан¹, Е. А. Живов^{2,3}, Д. С. Кульбацкий², А. С. Парамонов², Ю. Чэ¹, А. В. Кузнецов¹, А. В. Попов^{2,4}, М. П. Кирпичников^{2,5}, З. О. Шенкарев^{2,3*}, Е. Н. Люкманова^{1,2,3,5*}

¹Биологический факультет, Шэньчжэньский МГУ-ППИ Университет, провинция Гуандун, Шэньчжэнь, 518172 Китай

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997 Россия

³Московский центр перспективных исследований, Москва, 123592 Россия

⁴Курчатовский комплекс медицинской приматологии НИЦ «Курчатовский институт», Краснодарский край, Сочи, 354376 Россия

⁵Междисциплинарная научно-образовательная школа «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология», биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

*E-mail: zakhar-shenkarev@yandex.ru; lyukmanova_ekaterina@smbu.edu.cn

Поступила в редакцию 11.12.2024

Принята к печати 03.08.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27590

РЕФЕРАТ Токсин ProTx-I из яда тарантула *Thrixopelma pruriens* ингибирует потенциал-зависимые натриевые (Na_v), калиевые и кальциевые каналы, а также хемочувствительный канал TRPA1, влияя на процессы их активации. Благодаря активности в отношении каналов Na_v1.7, Na_v1.8 и TRPA1, участвующих в восприятии и распространении болевых сигналов, ProTx-I может рассматриваться в качестве модели для создания анальгетиков нового поколения. ProTx-I состоит из 35 аминокислотных остатков, при этом три дисульфидные связи в его структуре образуют мотив ингибиторного цистинового узла, что затрудняет рекомбинантную продукцию токсина. Разработка эффективной системы продукции ProTx-I необходима для изучения механизма действия токсина на молекулярном уровне. В представленной работе мы сравнили ряд подходов к бактериальной продукции дисульфидсодержащих токсинов. Цитоплазматическая экспрессия ProTx-I в составе слитого растворимого белка с тиоредоксином или глутатион-S-трансферазой не позволила получить правильно свернутый токсин. В то же время ProTx-I с природной структурой был получен в ходе «прямой» экспрессии в виде цитоплазматических телец включения с последующей ренатурацией, а также при секреции в периплазматическое пространство в слитой конструкции с мальтозосвязывающим белком. Активность рекомбинантного ProTx-I была изучена электрофизиологическими методами на ооцитах *Xenopus laevis*, экспрессирующих каналы TRPA1 крысы и человека. Токсин показал большую активность на канале крысы, чем на канале человека (IC₅₀ = 250 ± 70 и 840 ± 190 нМ соответственно). Также было обнаружено, что наличие дополнительного N-концевого остатка метионина у токсина, полученного в ходе «прямой» экспрессии, значительно ослабляет активность ProTx-I.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА цистинный узел, TRPA1, токсин, влияющий на активацию, бактериальная продукция, дисульфид-богатые белки.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АИТС – аллилизотиоцианат; GST – глутатион-S-трансфераза; ИСК – ингибиторный цистинный узел; MBP – мальтозосвязывающий белок; Na_v – потенциал-зависимый натриевый канал; TRX – тиоредоксин; ИПТГ – изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид.

ВВЕДЕНИЕ

Яды пауков – богатый источник полипептидных токсинов, действующих на различные мембранные рецепторы и ионные каналы [1–3]. Многие токсины пауков принадлежат к семейству ноттинов – небольших (20–50 а.о.) β -структурных пептидов, содержащих в своей структуре консервативный мотив «ингибиторного цистинового узла» (ICK) [4], образованный тремя дисульфидами C1–C4, C2–C5 и C3–C6. Такая пространственная структура обеспечивает высокую физико-химическую и протеолитическую стабильность ноттинов, что делает мотив ICK перспективной основой для дизайна новых пептидных препаратов [5].

Среди ноттинов пауков выделяют мембранотропные токсины, влияющие на активацию или инактивацию натриевых (Na_v), калиевых и кальциевых потенциал-зависимых каналов (так называемые gating modifier toxins) [6]. Токсин ProTx-I (Protoxin-I или β/ω -theraphotoxin-Tp1a, 35 а.о.) – мембранотропный ноттин перуанского зеленого бархатного тарантула *Thrixopelma pruriens*. ProTx-I эффективно ингибирует ряд потенциал-зависимых каналов [7], а также хемочувствительный канал TRPA1 [8]. Среди мишеней ProTx-I каналы $\text{Na}_v1.7$, $\text{Na}_v1.8$ и TRPA1 являются перспективными терапевтическими мишенями для лечения боли и неврологических воспалительных синдромов [9–11]. Изучение механизма действия ProTx-I на эти каналы может дать информацию, необходимую для создания новых анальгетиков и других биомедицинских препаратов.

Первым шагом, необходимым для изучения механизма действия ProTx-I, а также для дизайна новых вариантов этого ноттина, является разработка эффективной системы продукции. Традиционно небольшие полипептидные токсины, включая ноттины пауков, получают методами пептидного синтеза с последующей ренатурацией для формирования правильной системы дисульфидных связей [12]. Кроме того, рекомбинантные ноттины получают в клетках *Pichia pastoris* [12–14] и в клетках *Escherichia coli* [15, 16]. Однако при цитоплазматической продукции происходит накопление этих белков в виде нерастворимых телец включения [17, 18]. Для получения дисульфид-богатых токсинов в клетках *E. coli* применяют: (1) «прямую» экспрессию с последующим выделением пептида из телец включения и ренатурацией; (2) получение в виде слитых конструкций с белками, способствующими замыканию дисульфидных связей и повышающими уровень продукции, такими как, например, тиоредоксин А (TRX) или глутатион-S-трансфераза (GST); (3) секрецию рекомбинантных пептидов в периплазматическое пространство *E. coli*, в котором происходит образование дисульфидных связей [17, 19].

Мы сравнили эти подходы к бактериальной продукции ProTx-I и впервые получили корректно свернутый рекомбинантный токсин, активность которого охарактеризовали на каналах TRPA1 человека и крысы. Полученные данные показали значительную видоспецифичность ингибирующего действия ProTx-I, а также влияние N-концевой последовательности токсина на его активность. Разработанная система бактериальной продукции открывает новые возможности для получения мутантных и меченых изотопами вариантов ProTx-I для дальнейших структурных и функциональных исследований.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Конструирование экспрессионных векторов

Ген *ProTx-I* был сконструирован на основе аминокислотной последовательности P83480 из базы данных UniProt. Нуклеотидная последовательность гена была оптимизирована с учетом частоты использования кодонов в *E. coli*. Векторы для цитоплазматической экспрессии слитых белков TRX-ProTx-I и GST-ProTx-I получены путем клонирования гена *ProTx-I* в векторы *pET-32a(+)* (Novagene, США) и *pET-32a(+)/GST* по сайтам KpnI/BamHI и BamHI/HindIII соответственно. Плазмида *pET-32a(+)/GST* была получена ранее путем замены последовательности гена *TRX* в плазмиде *pET-32a(+)* на последовательность гена *GST*. Вектор для бактериальной секреции слитого белка MBP-ProTx-I получен путем клонирования гена *ProTx-I* по сайтам KpnI и SacI в плазмиду *pLicC-MBP-APETx2* (Addgene, #72668) [20]. Вектор для прямой экспрессии *Met-ProTx-I* получали путем клонирования гена *ProTx-I* в вектор *pET-22b(+)* (Novagene) по сайтам NdeI и BamHI. В этом случае N-конец молекулы ProTx-I содержал дополнительный остаток метионина, кодируемый стартовым кодоном ATG. Для продукции 6His-Met-ProTx-I на 5'-конец гена *ProTx-I* вставляли дополнительную последовательность, кодирующую 6His-tag, и линкерную последовательность, содержащую остаток метионина. Далее этот ген клонировали в вектор *pET-22b(+)* по сайтам NdeI и BamHI. Схема использованных конструкций приведена на рис. 1.

Бактериальная продукция слитых белков TRX-ProTx-I, GST-ProTx-I и MBP-ProTx-I

Для получения слитых белков TRX-ProTx-I и GST-ProTx-I штаммы *E. coli* BL21(DE3) и SHuffle T7 Express (NEB) трансформировали векторами *pET-32a(+)/TRX-ProTx-I* и *pET-32a(+)/GST-ProTx-I* соответственно. MBP-ProTx-I продуцировали в штамме *E. coli* Rosetta-gami (DE3). Клетки вы-

рашивали на среде ТВ (12 г бактотриптона, 24 г дрожжевого экстракта, 4 мл глицерина, 2.3 г KH_2PO_4 , 12.5 г K_2HPO_4 на 1 л среды, pH 7.4), содержащей 100 мкг/мл ампициллина (Sigma, США) до $\text{OD}_{600} \sim 0.6$. Экспрессию индуцировали, добавляя 0.1 mM изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ, Sigma). Клетки культивировали в течение 16 ч при 20°C в случае GST-ProTx-I или 72 ч при 13°C в случае MBP-ProTx-I и TRX-ProTx-I.

Бактериальная продукция Met-ProTx-I и 6His-Met-ProTx-I

Met-ProTx-I и 6His-Met-ProTx-I получали в штамме *E. coli* BL21(DE3), трансформированном векторами *pET-22b(+)/Met-ProTx-I* или *pET-22b(+)/6His-Met-ProTx-I* соответственно. Для получения Met-ProTx-I клетки выращивали на среде ТВ при 37°C до $\text{OD}_{600} \sim 0.6$ и индуцировали экспрессию, добавляя 0.2 mM ИПТГ. Для получения 6His-Met-ProTx-I клетки выращивали на среде SB (32 г бактотриптона, 20 г дрожжевого экстракта, 5 г NaCl, pH 7.4) при 37°C до $\text{OD}_{600} \sim 6.0$ и индуцировали экспрессию 1 mM ИПТГ. После индукции культивирование продолжали в течение 18 ч при 37°C.

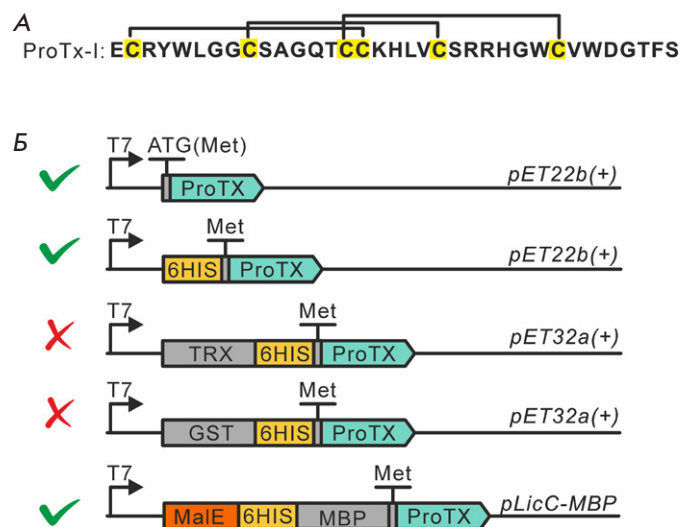


Рис. 1. Дизайн генетических конструкций для получения ProTx-I в клетках *E. coli*. А – аминокислотная последовательность токсина ProTx-I. Остатки цистеинов показаны желтым цветом, линиями обозначены дисульфидные связи. Б – схемы генетических конструкций. Сверху вниз: векторы для «прямой» продукции Met-ProTx-I и 6His-Met-ProTx-I; векторы для цитоплазматической продукции ProTx-I в виде слитых белков с TRX и GST; вектор для секреции ProTx-I в виде слитого белка с MBP. Зелеными галочками отмечены конструкции, с использованием которых удалось получить рекомбинантный ProTx-I в структурированном виде

Выделение и хроматографическая очистка слитых белков TRX-ProTx-I, GST-ProTx-I и MBP-ProTx-I

Клетки собирали центрифугированием при 10000 g в течение 20 мин и 4°C. Клеточный осадок ресуспендировали в буфере А (20 mM Трис-HCl, 300 mM NaCl, pH 8.0) в присутствии 1 mM фенолметилсульфонилфторида (PMSF, Sigma). Клетки разрушали ультразвуком (Branson Digital Sonifier, США) при выходной мощности прибора 500 Вт и 4°C в течение 6 мин. Суспензию центрифугировали при 30000 g в течение 30 мин при 4°C. Очистку слитых белков осуществляли с помощью металл-аффинной хроматографии на смоле Ni-Sephарose FastFlow (Cytiva, США), предварительно уравновешенной в буфере А. Рекомбинантные белки элюировали ступенчатым градиентом концентрации имидазола (Macklin, Китай) от 20 до 500 mM.

Выделение и очистка восстановленных Met-ProTx-I и 6His-Met-ProTx-I

Выделение сульфитированного Met-ProTx-I из цитоплазматических телец включения и его хроматографическую очистку в денатурирующих условиях проводили согласно протоколам, описанным ранее [19]. После хроматографии Met-ProTx-I восстанавливали 500-кратным молярным избытком дитиотреитола (ДТТ, Sigma). Цитоплазматические тельца включения, содержащие 6His-Met-ProTx-I, солибилизировали в денатурирующем буфере (20 mM Трис-HCl, 300 mM NaCl, 10 mM β -меркаптоэтанол, 8 M мочевины, pH 8.0) в течение 3 ч, центрифугировали и супернатант наносили на хроматографическую смолу Ni-Sephарose FastFlow, уравновешенную денатурирующим буфером. 6His-Met-ProTx-I элюировали ступенчатым градиентом концентрации имидазола (20–500 mM). Перед гидролизом с помощью BrCN (Sigma) в хроматографические фракции 6His-Met-ProTx-I добавляли 500-кратный молярный избыток ДТТ.

Гидролиз рекомбинантных белков с помощью BrCN

Полученные рекомбинантные белки 6His-Met-ProTx-I, TRX-ProTx-I, GST-ProTx-I и MBP-ProTx-I в концентрации 4 мг/мл гидролизovali, добавляя 0.3 M HCl и 50-кратный молярный избыток (по отношению к остаткам метионина) BrCN. Реакцию проводили в течение ночи в темноте при комнатной температуре. Затем BrCN удаляли выпариванием на приборе Centrivap (Labconco, США), оснащенном криогенной ловушкой.

Ренатурация Met-ProTx-I и ProTx-I

Ренатурацию Met-ProTx-I и ProTx-I (полученного в результате гидролиза 6His-Met-ProTx-I с помо-

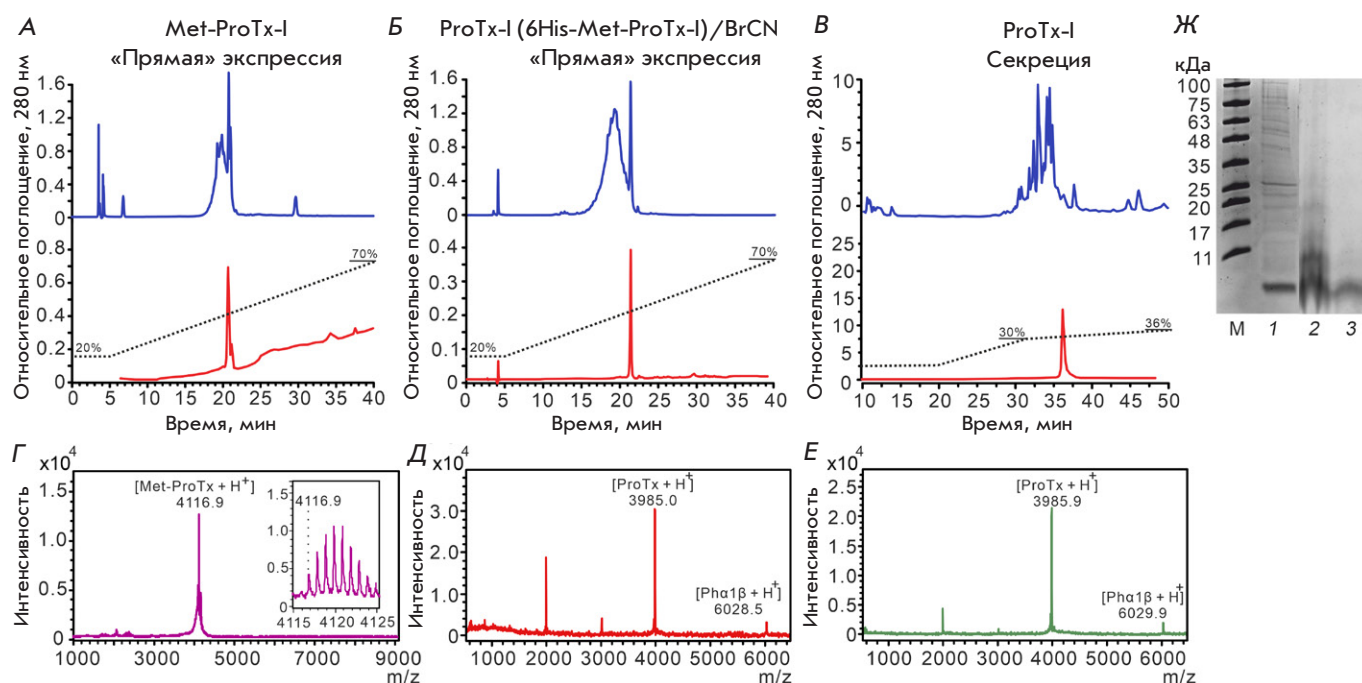


Рис. 2. Анализ рекомбинантных вариантов ProTx-I методами ВЭЖХ, масс-спектрометрии и SDS-ПААГ-электрофореза. А, Б, В – репрезентативные хроматограммы ВЭЖХ-очистки (верхняя панель) и ВЭЖХ-анализ очищенных вариантов ProTx-I (нижняя панель), полученных разными способами: ренатурированный Met-ProTx-I (А), ренатурированный ProTx-I после гидролиза 6His-Met-ProTx-I с помощью BrCN (Б), ProTx-I после гидролиза секретируемого MBP-ProTx-I с помощью BrCN (В). Г–Е – MALDI-MS- спектры вариантов ProTx-I, представленных на панелях (А–В). В образцы, показанные на Д и Е, дополнительно добавляли токсин Phα1β. На Д и Е также наблюдаются двухзарядные ионы [ProTx-I+2H⁺] и [Phα1β+2H⁺]. Ж – электрофоретический анализ препаратов ProTx-I, полученных в результате «прямой» экспрессии: М – маркер (BioSharp BL712A); 1 – Met-ProTx-I до ренатурации; 2 – ProTx-I, полученный в результате гидролиза 6His-Met-ProTx-I с помощью BrCN, до ренатурации; 3 – препарат с дорожки 2 после ренатурации

щью BrCN) инициировали переносом рекомбинантных белков в ренатурирующий буфер (0.1 М Трис-HCl, 2 М мочеви́на, 1.5 мМ GSH и 0.15 мМ GSSG, pH 7.5) с помощью гель-фильтрации на хроматографических колонках NAP-25 (Cytiva). Финальная концентрация рекомбинантных токсинов в ренатурирующем буфере составляла 0.02 мг/мл.

Хроматографическая очистка и анализ рекомбинантных вариантов ProTx-I с помощью ВЭЖХ

ВЭЖХ рекомбинантных вариантов ProTx-I проводили на колонке Jupiter C4 (A300, 4.6 × 250 мм, Phenomenex) с использованием хроматографов Vanquish Core и Ultimate 3000 (ThermoFisher, США). Токсины элюировали градиентом ацетонитрила в присутствии 0.1% трифторуксусной кислоты при скорости потока 1 мл/мин. Полученные препараты токсинов лиофилизировали.

Масс-спектрометрия

Препарат Met-ProTx-I анализировали в рефлексном режиме детекции положительно заряженных ионов на спектрометре Rapiflex MALDI-TOF/TOF (Bruker, Германия). В результате было получено

значение m/z (4116.9 Да, рис. 2Г), близкое к ожидаемой моноизотопной массе [Met-ProTx-I+H⁺] 4116.7 Да, соответствующей молекуле токсина с замкнутыми дисульфидными связями.

Анализ вариантов ProTx-I, полученных в результате гидролиза 6His-Met-ProTx-I (рис. 2Д) или бактериальной секреции (рис. 2Е), проводили на спектрометре Ultraflex MALDI-TOF/TOF (Bruker, Германия). Для калибровки спектрометра использовали продукты автолиза трипсина. Молекулярные массы ProTx-I – 3985.0 и 3985.9 Да, – полученные в обоих случаях, соответствовали расчетной моноизотопной массе ProTx-I (3985.7 Да, [ProTx-I+H⁺]) в пределах погрешности измерения. В обоих случаях для проверки калибровки в образцы дополнительно добавляли токсин Phα1β (расчетная масса 6029.5 Да [Phα1β+H⁺]), для которого были получены массы 6028.5 и 6029.9 Да соответственно.

ЯМР-спектроскопия

Спектры ЯМР измеряли в водном растворе (5% D₂O, pH 4.5, 30°C), используя ЯМР-спектрометр AVANCE-800 (Bruker) с рабочей частотой протонов 800 МГц. В качестве положительного контроля кор-

ректной пространственной структуры использовали коммерческий препарат токсина, полученный путем химического синтеза (Smartox Biotechnology Inc., Франция).

Электрофизиологические эксперименты

Регистрацию токов через TRPA1 человека и крысы [21] проводили в ооцитах *X. laevis*, экспрессирующих эти каналы. Выделение ооцитов, инъекция мРНК и запись экспериментов описаны ранее в [22]. Все растворы готовили в день эксперимента на основе ND-96 без кальция, содержащего (в mM) 96 NaCl, 2 KCl, 1 MgCl₂ и 10 HEPES при pH 7.4. Токи стимулировали аппликацией 100 мкМ AITC (Sigma-Aldrich), раствор добавляли вручную в перфузионную камеру, запись токов проводили с пилообразным изменением напряжения как описано в [22]. Для каждого ооцита последовательно записывали три ответа на аппликацию AITC, а также последующий ток утечки в присутствии специфического ингибитора TRPA1 HC030031 (Sigma-Aldrich). Амплитуду первого ответа использовали для нормирования данных, полученных на разных ооцитах. Для возбуждения второго ответа AITC подавали вместе с ProTx-I или HC030031. Амплитуду этого ответа измеряли, нормировали, усредняли между разными ооцитами и использовали для построения кривых доза-ответ. Кривые доза-ответ аппроксимировали уравнением Хилла:

$$Y = \frac{100\%}{1 + \left(\frac{[ProTx-I]}{EC_{50}}\right)^{nH}},$$

где nH – коэффициент Хилла.

Статистическую обработку результатов осуществляли в программе GraphPad Prism 9.0. Для сравнения амплитуд токов при определенных концентрациях токсина использовали либо двусторонний t -критерий Стьюдента, либо однофакторный дисперсионный анализ ANOVA и критерий Даннетта для множественного сравнения. Сравнение параметров кривых доза-ответ осуществляли с помощью F-теста.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Продукция ProTx-I в слитой конструкции с TRX и GST

Для получения рекомбинантного ProTx-I были протестированы пять различных подходов. ProTx-I получали в виде слитых с белками-партнерами растворимых белков: TRX, GST и мальтозосвязывающим белком (MBP), а также с шестью N-концевыми остатками гистидина (6His-tag) и без них в виде цитоплазматических телец включения (рис. 1). Эффективность рекомбинантной продукции токсинов

пауков в связке с TRX и GST показана ранее [23–26], а эффективность продукции в виде цитоплазматических телец включения с последующей ренатурацией продемонстрирована нами для ряда дисульфид-богатых белков, включая токсины из яда змей и белки человека семейства Ly6/uPAR [27].

Культивирование клеток BL21(DE3), трансформированных плазмидой *pET-32a/ProTx-I*, при 37°C приводило к получению слитого белка TRX-ProTx-I в нерастворимом виде, в то время как понижение температуры культивирования клеток до 13°C позволило получить растворимый белок с выходом 20 мг/л бактериальной культуры. Поскольку молекула ProTx-I не содержит остатки метионина, мы использовали BrCN для гидролиза слитого белка [28] по дополнительному остатку метионина, введенному перед первым остатком ProTx-I. Анализ очищенного препарата ProTx-I с помощью MALDI подтвердил ожидаемую молекулярную массу токсина с замкнутыми дисульфидными связями. Однако сравнение ¹H-ЯМР-спектров рекомбинантного токсина и коммерческого препарата ProTx-I выявило отсутствие корректной пространственной структуры у рекомбинантного ProTx-I (рис. 3А, Д). Использование GST в качестве белка-партнера также не позволило получить ProTx-I в структурированном виде. Эти результаты подчеркивают необходимость анализа пространственной структуры рекомбинантных токсинов, поскольку их получение в растворимом виде с белками-партнерами и с ожидаемой молекулярной массой не гарантирует правильного сворачивания белковой молекулы и образования корректных дисульфидных связей.

Получение Met-ProTx-I из телец включения

Ген *ProTx-I* содержит на 5'-конце стартовый кодон ATG, необходимый для инициации трансляции, поэтому итоговый рекомбинантный продукт при его получении в виде цитоплазматических телец включения содержит дополнительный N-концевой остаток метионина (рис. 1Б). Для очистки Met-ProTx-I мы использовали ранее разработанный протокол, включающий солюбилизацию токсина из цитоплазматических телец включения в денатурированном виде с остатками цистеина, химически модифицированными до S-сульфоната, и последующую ионообменную хроматографию на смоле DEAP-spheronite-ОН [27]. Выход денатурированного Met-ProTx-I на этой стадии составил 6 мг/л бактериальной культуры. Очищенный препарат Met-ProTx-I обрабатывали ДТТ для снятия S-сульфонатных групп с остатков цистеина, затем удаляли ДТТ с помощью гель-фильтрации и переносили токсин в буфер для ренатурации. Протокол ренатурации токсина был основан на протоколе, опубликованном

ранее для химически синтезированного ProTx-I [29] и сходен с используемыми нами протоколами для ренатурации других дисульфид-богатых белков [27]. Ренатурированный Met-ProTx-I, очищенный с помощью ВЭЖХ в градиенте ацетонитрила (рис. 2А), имел природную структуру (рис. 3Б), однако эффективность ренатурации токсина при таком подходе оказалась крайне низкой. Конечный выход ренатурированного продукта составил всего ~ 0.05 мг/л бактериальной культуры.

Получение ProTx-I с природной N-концевой последовательностью

Низкая эффективность ренатурации Met-ProTx-I могла быть связана с недостаточной чистотой препарата перед ренатурацией. Для повышения чистоты токсина перед ренатурацией и, как следствие, повышения выхода ренатурированного ProTx-I в N-концевую последовательность ProTx-I ввели последовательность 6His-tag. Похожий подход использовали ранее для рекомбинантной продукции других токсинов пауков [30]. Известно, что дополнительные остатки в N-концевой последовательности токсинов могут влиять на их структуру и активность [31], поэтому для получения токсина с природной N-концевой последовательностью после 6His-tag был введен дополнительный остаток метионина для последующего гидролиза с помощью BrCN (рис. 1Б). Выход 6His-Met-ProTx-I после очистки с помощью металл-хелатной хроматографии составил ~ 13 мг/л бактериальной культуры. Таким образом, введение 6His-tag в N-концевую последовательность позволило не только увеличить чистоту препарата токсина перед ренатурацией (рис. 2Ж), но и поднять уровень продукции токсина, что находится в согласии с нашим более ранним наблюдением, согласно которому N-концевая последовательность может влиять на выход рекомбинантных белков [32]. Денатурированный препарат токсина 6His-Met-ProTx-I гидролизовали с помощью BrCN, далее ренатурацию проводили аналогично препарату Met-ProTx-I. Конечный выход ренатурированного препарата ProTx-I с природной N-концевой последовательностью составил после ВЭЖХ (рис. 2Б) 0.3 мг/л бактериальной культуры. Таким образом, введение 6His-tag в молекулу ProTx-I позволило не только повысить продукцию токсина, но и получить пептид с природной последовательностью в структурированном виде, что подтверждено данными ЯМР-спектроскопии (рис. 3В).

Секреция ProTx-I

Альтернативным способом продукции белков с корректно замкнутыми дисульфидными связями в клет-

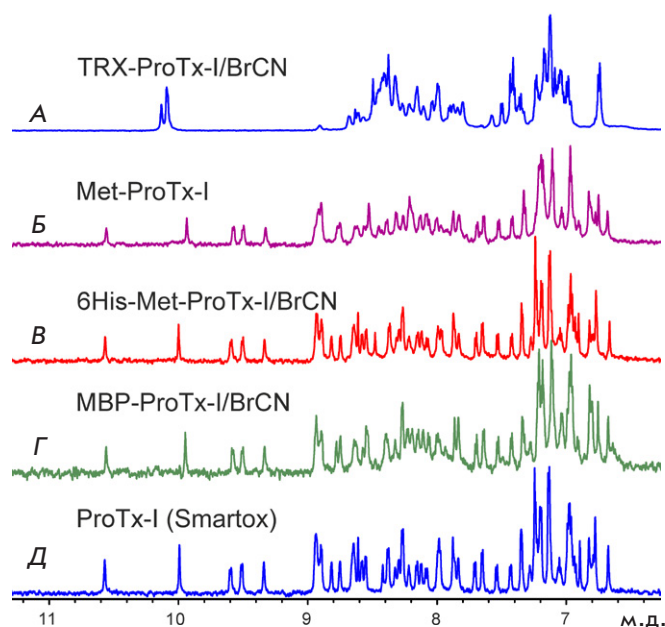


Рис. 3. 1D ^1H -ЯМР-спектры вариантов ProTx-I (pH 4.5, 30°C). А – спектр неправильно свернутого ProTx-I, полученного в результате продукции слитого белка TRX-ProTx-I и гидролиза BrCN. Б – спектр Met-ProTx-I, полученного в виде телец включения и последующей ренатурации. В – спектр ProTx-I, полученного в виде телец включения (конструкция 6His-Met-ProTx-I), после гидролиза BrCN и ренатурации. Г – спектр ProTx-I, полученного в результате секреции слитой конструкции MBP-ProTx-I и гидролиза BrCN. Д – спектр коммерческого препарата ProTx-I, полученного методом химического синтеза

ках *E. coli* является секреция в периплазматическое пространство [20]. Для повышения уровня продукции токсина использовали слитую конструкцию с MBP, а для секреции в периплазматическое пространство в N-концевую последовательность MBP вводили сигнальный пептид MalE [33] (рис. 1Б). Для последующего отщепления ProTx-I от MBP перед последовательностью токсина встраивали остаток метионина. На этом этапе мы использовали штамм *E. coli* Rosetta-gamiTM (производное OrigamiTM), хорошо зарекомендовавший себя для получения дисульфид-богатых белков, включая токсины животных [34, 35]. Для увеличения выхода белка в растворимом виде мы понижали температуру культивирования клеток после индукции до 13°C, что позволяет замедлить скорость синтеза белка и способствует формированию корректно замкнутых дисульфидных связей [36]. Выход белка MBP-ProTx-I после очистки из суммарного клеточного лизата с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии составил 75 мг/л бактериальной культуры. Далее белок MBP-ProTx-I гидролизовали с помощью BrCN, и ProTx-I с природной N-концевой последовательностью очищали с помощью ВЭЖХ (рис. 2Б). Финальный выход секретиру-

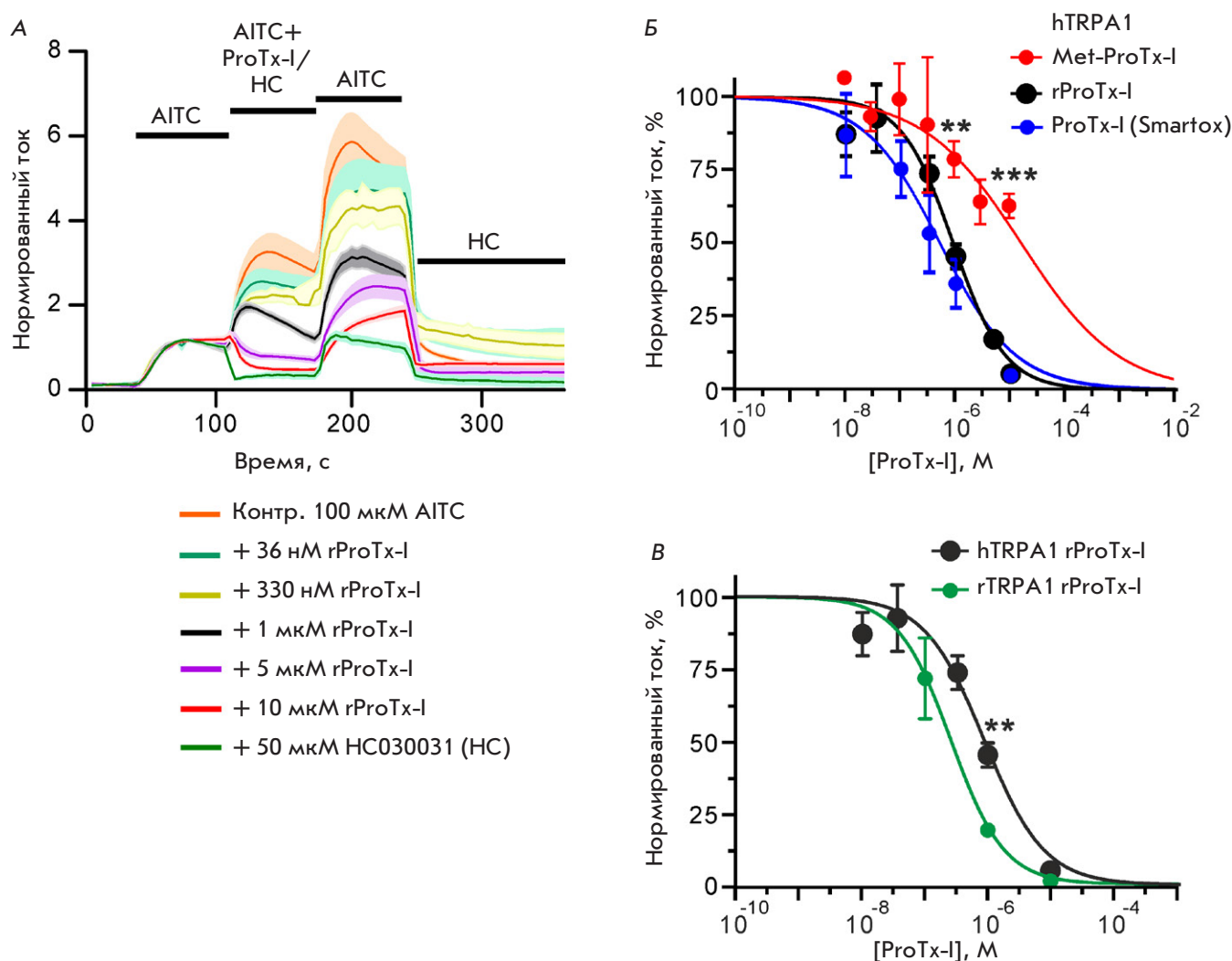


Рис. 4. Действие вариантов ProTx-I на направленные наружу AITC-индуцированные токи в ооцитах *X. laevis*, экспрессирующих TRPA1. **А** – усредненные нормированные записи токов через канал TRPA1 человека в отсутствие и в присутствии селективного антагониста HC030031 или ProTx-I. Данные представлены как среднее \pm SEM (линии и затененные области соответственно, $n = 3-6$ ооцитов). Периоды аппликации веществ показаны горизонтальными линиями. **Б** – кривые доза-ответ для ингибирования TRPA1 человека рекомбинантными препаратами rProTx-I, Met-ProTx-I и коммерческим ProTx-I (Smartox). **($p < 0.01$) и ***($p < 0.001$) указывают на значительное отличие амплитуды тока между препаратом Met-ProTx-I и препаратами rProTx-I и ProTx-I (Smartox) согласно критерию ANOVA/Даннетт. Различия в значениях IC_{50} для соответствующих кривых, аппроксимированных уравнением Хилла (табл. 1), статистически значимо с $p < 0.0001$ (F-тест). **В** – кривые доза-ответ для рекомбинантного препарата rProTx-I в отношении TRPA1 человека (hTRPA1) и крысы (rTRPA1). Различия в значениях IC_{50} для этих кривых статистически значимо с $p = 0.006$ (F-тест). **($p < 0.01$) указывает на значительное отличие амплитуды токов на каналах крысы и человека согласно двустороннему t -тесту. Данные на Б и В (среднее \pm SEM, $n = 3-6$ ооцитов) нормированы на ответ, записанный без ProTx-I (100%)

Таблица 1. Параметры уравнения Хилла для анализа кривых ингибирования

Рецептор/токсин	IC_{50} , мкМ	Коэффициент Хилла
hTRPA1/Met-ProTx-I	8.9 ± 7.0	$=1.0^*$
hTRPA1/ProTx-I (Smartox)	0.41 ± 0.16	0.68 ± 0.24
hTRPA1/rProTx-I	0.84 ± 0.19	0.91 ± 0.18
rTRPA1/rProTx-I	0.25 ± 0.07	1.03 ± 0.26

*При анализе кривой доза-ответ для этого варианта токсина коэффициент Хилла предполагали равным 1.0.

емого корректно свернутого ProTx-I (рис. 3Г) составил ~ 0.15 мг/л бактериальной культуры. Небольшие отличия в положении отдельных сигналов в ЯМР-спектрах рекомбинантного и коммерческого токсина (рис. 3Г, Д) объясняются вариацией pH в образцах (в пределах 0.1 ед.).

N-концевая последовательность ProTx-I влияет на взаимодействие токсина с TRPA1

Активность химически синтезированного ProTx-I была показана ранее на клетках HEK293, экспрессирующих рецепторы TRPA1 человека и мыши [8]. В настоящей работе сравнили функциональную активность Met-ProTx-I и ProTx-I, полученного в результате гидролиза 6His-Met-ProTx-I, на канале TRPA1 человека, экспрессированного в ооцитах *X. laevis*. В соответствии с [8] обнаружили, что 10 мкМ рекомбинантного ProTx-I почти полностью ингибирует ток через канал TRPA1, индуцированный 100 мкМ ковалентного агониста аллилизотиоцианата (AITC) (рис. 4А). Этот эффект был аналогичен эффекту 50 мкМ HC030031 – селективного антагониста TRPA1 (рис. 4А).

Сравнение кривых доза-ответ рекомбинантного и коммерческого ProTx-I подтвердило близкие свойства препаратов (рис. 4Б, табл. 1). Параметры кривых (IC_{50} и коэффициент Хилла) статистически не различались. Однако анализ Met-ProTx-I выявил драматическое статистически значимое падение активности этого варианта токсина. Так, при концентрации 10 мкМ рекомбинантный и синтетический ProTx-I ингибировали токи до ~ 5%, а Met-ProTx-I только до ~ 60 %, а значение IC_{50} увеличилось на порядок (рис. 4Б, табл. 1). Таким образом, N-концевая аминокислотная последовательность токсина критически важна для взаимодействия с рецептором. Примечательно, что ранее полученные данные об активном сайте ProTx-I не включали N-концевые остатки [8].

ProTx-I ингибирует TRPA1 крысы эффективнее, чем канал человека

Сравнение активности рекомбинантного ProTx-I на каналах TRPA1 крысы и человека выявило более высокую активность токсина по отношению к рецептору крысы (IC_{50} ~ 250 и 840 нМ соответственно, разница в IC_{50} статистически значима, рис. 4В,

табл. 1). Примечательно, что ранее проведенное сравнительное исследование ProTx-I на TRPA1 человека и мыши, наоборот, выявило большую активность на канале человека [8]. Разница в действии токсина на рецепторы человека, крысы и мыши может объясняться значительными отличиями в аминокислотной последовательности внеклеточных петель S1-S2 и S3-S4 канала TRPA1 – основного сайта взаимодействия токсина [8]. Так, консервативный остаток Glu754 (нумерация дана для канала человека) заменен у мыши на Gly, а Glu825 в канале человека – на Asp у крысы и Asn у мыши. Кроме того, имеются и другие точечные отличия. В результате в канале мыши два отрицательно заряженных остатка в сайте связывания токсина заменены нейтральными остатками, что, вероятно, и ослабляет связывание положительно заряженной молекулы токсина (заряд +2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые разработана система рекомбинантной продукции токсина ProTx-I. Показано, что ProTx-I проявляет разную активность по отношению к каналам TRPA1 человека и крысы, а модификация N-концевой последовательности ProTx-I может привести к инактивации токсина. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-14-00326).

Работа Ю. Чэ поддержана проектом министерства образования провинции Гуандун Китая (№ 2022KCXTD034).

Работа М.А. Шулепко, А.В. Кузнецова и Е.Н. Люкмановой поддержана ключевым специальным проектом министерства образования провинции Гуандун Китая (№ 2023ZDZX2072).

Работа А.В. Попова (конструирование экспрессионных векторов) была выполнена в рамках государственного задания НИЦ «Курчатовский институт» с использованием оборудования ЦКП «Примат».

Авторы выражают благодарность ЦКП «Протеом человека» Института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича (Москва, Россия) за масс-спектрометрические измерения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kuhn-Nentwig L, Stöcklin R, Nentwig W. Venom Composition and Strategies in Spiders. In: *Advances in Insect Physiology*. Vol 40. Elsevier; 2011:1–86. doi: 10.1016/B978-0-12-387668-3.00001-5
2. Peigneur S, de Lima ME, Tytgat J. Phoneutria nigriventer venom: A pharmacological treasure. *Toxicon*. 2018;151:96–110. doi: 10.1016/j.toxicon.2018.07.008
3. Lyukmanova EN, Shenkarev ZO. Toxins from Animal Venom—A Rich Source of Active Compounds with High Pharmacological Potential. *Toxins*. 2024;16(12):512. doi: 10.3390/toxins16120512
4. Cardoso FC, Lewis RJ. Structure-Function and Therapeutic Potential of Spider Venom-Derived Cysteine Knot Peptides Targeting Sodium Channels. *Front Pharmacol*. 2019;10:366. doi: 10.3389/fphar.2019.00366
5. Kintzing JR, Cochran JR. Engineered knottin peptides as diagnostics, therapeutics, and drug delivery vehicles. *Curr*

- Opin Chem Biol.* 2016;34:143–150. doi: 10.1016/j.cbpa.2016.08.022
6. Milesu M, Bosmans F, Lee S, Alabi AA, Kim JI, Swartz KJ. Interactions between lipids and voltage sensor paddles detected with tarantula toxins. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16(10):1080–1085. doi: 10.1038/nsmb.1679
 7. Middleton RE, Warren VA, Kraus RL, et al. Two tarantula peptides inhibit activation of multiple sodium channels. *Biochemistry.* 2002;41(50):14734–14747. doi: 10.1021/bi026546a
 8. Gui J, Liu B, Cao G, et al. A Tarantula-Venom Peptide Antagonizes the TRPA1 Nociceptor Ion Channel by Binding to the S1–S4 Gating Domain. *Current Biology.* 2014;24(5):473–483. doi:10.1016/j.cub.2014.01.013
 9. Maatuf Y, Geron M, Priel A. The Role of Toxins in the Pursuit for Novel Analgesics. *Toxins (Basel).* 2019;11(2). doi:10.3390/toxins11020131
 10. Souza Monteiro de Araujo D, Nassini R, Geppetti P, De Logu F. TRPA1 as a therapeutic target for nociceptive pain. *Expert Opinion on Therapeutic Targets.* 2020;24(10):997–1008. doi: 10.1080/14728222.2020.1815191
 11. Dormer A, Narayanan M, Schentag J, et al. A Review of the Therapeutic Targeting of SCN9A and Na_v1.7 for Pain Relief in Current Human Clinical Trials. *J Pain Res.* 2023;16:1487–1498. doi: 10.2147/JPR.S388896
 12. Moore SJ, Cochran JR. Engineering knottins as novel binding agents. *Methods Enzymol.* 2012;503:223–251. doi: 10.1016/B978-0-12-396962-0.00009-4
 13. Fitches EC, Pyati P, King GF, Gatehouse JA. Fusion to snowdrop lectin magnifies the oral activity of insecticidal ω -Hexatoxin-Hv1a peptide by enabling its delivery to the central nervous system. *PLoS One.* 2012;7(6):e39389. doi: 10.1371/journal.pone.0039389
 14. Yang S, Pyati P, Fitches E, Gatehouse JA. A recombinant fusion protein containing a spider toxin specific for the insect voltage-gated sodium ion channel shows oral toxicity towards insects of different orders. *Insect Biochem Mol Biol.* 2014;47(100):1–11. doi: 10.1016/j.ibmb.2014.01.007
 15. Monfared N, Ahadiyat A, Fathipour Y, Mianroodi RA. Evaluation of recombinant toxin JFTX-23, an oral-effective anti-insect peptide from the spider *Selenocosmia jiafu* venom gland proteome. *Toxicon.* 2022;217:78–86. doi: 10.1016/j.toxicon.2022.08.003
 16. Matsubara FH, Meissner GO, Herzig V, et al. Insecticidal activity of a recombinant knottin peptide from *Loxosceles intermedia* venom and recognition of these peptides as a conserved family in the genus. *Insect Mol Biol.* 2017;26(1):25–34. doi: 10.1111/imb.12268
 17. Costa S, Almeida A, Castro A, Domingues L. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Front Microbiol.* 2014;5:63. doi: 10.3389/fmicb.2014.00063
 18. Berlec A, Strukelj B. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2013;40(3–4):257–274. doi: 10.1007/s10295-013-1235-0
 19. Klint JK, Senff S, Saez NJ, et al. Production of recombinant disulfide-rich venom peptides for structural and functional analysis via expression in the periplasm of *E. coli*. *PLoS One.* 2013;8(5):e63865. doi: 10.1371/journal.pone.0063865
 20. Anangi R, Rash LD, Mobli M, King GF. Functional Expression in *Escherichia coli* of the Disulfide-Rich Sea Anemone Peptide APETx2, a Potent Blocker of Acid-Sensing Ion Channel 3. *Marine Drugs.* 2012;10(7):1605–1618. doi: 10.3390/md10071605
 21. Logashina YA, Solstad RG, Mineev KS, et al. New Disulfide-Stabilized Fold Provides Sea Anemone Peptide to Exhibit Both Antimicrobial and TRPA1 Potentiating Properties. Published online 2017:23.
 22. Lyukmanova EN, Mironov PA, Kulbatskii DS, et al. Recombinant Production, NMR Solution Structure, and Membrane Interaction of the Ph α 1 β Toxin, a TRPA1 Modulator from the Brazilian Armed Spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxins.* 2023;15(6):378. doi: 10.3390/toxins15060378
 23. Berkut AA, Peigneur S, Myshkin MY, et al. Structure of Membrane-active Toxin from Crab Spider *Heriades mello-teei* Suggests Parallel Evolution of Sodium Channel Gating Modifiers in Araneomorphae and Mygalomorphae. *J Biol Chem.* 2015;290(1):492–504. doi: 10.1074/jbc.M114.595678
 24. Shlyapnikov YM, Andreev YA, Kozlov SA, Vassilevski AA, Grishin EV. Bacterial production of laticarin 2a, a potent antimicrobial peptide from spider venom. *Protein Expression and Purification.* 2008;60(1):89–95. doi: 10.1016/j.pep.2008.03.011
 25. Paiva ALB, Matavel A, Peigneur S, et al. Differential effects of the recombinant toxin PnTx4(5–5) from the spider *Phoneutria nigriventer* on mammalian and insect sodium channels. *Biochimie.* 2016;121:326–335. doi: 10.1016/j.biochi.2015.12.019
 26. Zhang H, Huang PF, Meng E, et al. An efficient strategy for heterologous expression and purification of active peptide hainantoxin-IV. *PLoS One.* 2015;10(2):e0117099. doi: 10.1371/journal.pone.0117099
 27. Shulepko MA, Lyukmanova EN, Shenkarev ZO, et al. Towards universal approach for bacterial production of three-finger Ly6/uPAR proteins: Case study of cytotoxin I from cobra *N. oxiana*. *Protein Expr Purif.* 2017;130:13–20. doi: 10.1016/j.pep.2016.09.021
 28. Andreev YA, Kozlov SA, Vassilevski AA, Grishin EV. Cyanogen bromide cleavage of proteins in salt and buffer solutions. *Anal Biochem.* 2010;407(1):144–146. doi: 10.1016/j.ab.2010.07.023
 29. Rupasinghe DB, Herzig V, Vetter I, et al. Mutational analysis of ProTx-I and the novel venom peptide PeIb provide insight into residues responsible for selective inhibition of the analgesic drug target Na_v1.7. *Biochem Pharmacol.* 2020;181:114080. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114080
 30. Vásquez-Escobar J, Benjumea-Gutiérrez DM, Lopera C, et al. Heterologous Expression of an Insecticidal Peptide Obtained from the Transcriptome of the Colombian Spider *Phoneutria depilate*. *Toxins (Basel).* 2023;15(7):436. doi: 10.3390/toxins15070436
 31. Dubovskii PV, Dubinnyi MA, Konshina AG, et al. Structural and Dynamic “Portraits” of Recombinant and Native Cytotoxin I from *Naja oxiana*: How Close Are They? *Biochemistry.* 2017;56(34):4468–4477. doi: 10.1021/acs.biochem.7b00453
 32. Lyukmanova EN, Shenkarev ZO, Khabibullina NF, et al. N-terminal fusion tags for effective production of g-protein-coupled receptors in bacterial cell-free systems. *Acta Naturae.* 2012;4(4):58–64.
 33. Saez NJ, Cristofori-Armstrong B, Anangi R, King GF. A Strategy for Production of Correctly Folded Disulfide-Rich Peptides in the Periplasm of *E. coli*. *Methods Mol Biol.* 2017;1586:155–180. doi: 10.1007/978-1-4939-6887-9_10
 34. Li J, Zhang H, Liu J, Xu K. Novel genes encoding six kinds of three-finger toxins in *Ophiophagus hannah* (king cobra) and function characterization of two recombinant long-chain neurotoxins. *Biochem J.* 2006;398(2):233–242. doi: 10.1042/BJ20060004
 35. Clement H, Flores V, De la Rosa G, Zamudio F, Alagon A, Corzo G. Heterologous expression, protein folding and antibody recognition of a neurotoxin from the Mexican coral snake *Micrurus laticorallus*. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2016;22(1):25. doi: 10.1186/s40409-016-0080-9
 36. Lyukmanova EN, Shulga AA, Arsenieva DA, et al. A Large-Scale Expression in *Escherichia coli* of Neurotoxin II from *Naja oxiana* Fused with Thioredoxin. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* 2004;30(1):25–34. doi: 10.1023/B:RUBI.0000015770.38602.e3