

РЕКОМБИНАНТНАЯ ПРОДУКЦИЯ
И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ТОКСИНА TS1 ИЗ ЯДА БРАЗИЛЬСКОГО СКОРПИОНА

Tityus serrulatus

З. О. Шенкарёв^{1,2,*}, М. А. Шулепко^{1,3}, С. Пеньёр (S. Peigneur)⁴,
М. Ю. Мышкин^{1,2}, А. А. Беркут^{1,2}, А. А. Василевский^{1,2}, Я. Титгат (J. Tytgat)⁴,
Е. Н. Люкманова^{1,3}, академик РАН М. П. Кирпичников^{1,3}

Поступило 15.08.2018 г.

Разработана эффективная бактериальная система продукции β -токсина Ts1 – основного компонента яда бразильского скорпиона *Tityus serrulatus*. Рекombинантный токсин и его ¹⁵N-меченый аналог получены в ходе прямой экспрессии синтетического гена в *Escherichia coli* с последующей ренатурацией из телец включения. Методом ЯМР-спектроскопии показано, что токсин структурирован в водном растворе, и его молекула содержит значительную долю β -структурных элементов. В процессе ренатурации токсина также наблюдали образование стабильного дисульфидного изомера Ts1, обладающего неупорядоченной структурой. Рекombинантный Ts1 блокировал ток ионов Na⁺ через каналы Na_v1.5, не влияя на процессы активации и инактивации. Эффект в отношении каналов Na_v1.4 выражен сдвигом кривой зависимости активации в область более отрицательных значений мембранного потенциала.

Ключевые слова: ренатурация белка, взаимодействие лиганд-рецептор, ЯМР-спектроскопия, натриевые каналы, β -токсины скорпионов.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524841112-116>

Потенциалзависимые Na⁺-каналы (Na_v) – мембранные белки, отвечающие за восходящую фазу потенциала действия в электровозбудимых клетках. Эти каналы состоят из порообразующей α -субъединицы, с которой ассоциированы регуляторные β -субъединицы. α -Субъединица включает в себя четыре гомологичных повтора (DI–DIV), каждый из которых содержит потенциалчувствительный домен (ПЧД, трансмембранные сегменты S1–S4) и сегменты S5–S6, формирующие пору канала (рис. 1а) [1].

Известно десять генов, кодирующих α -субъединицы Na_v млекопитающих. Мутации в этих генах ассоциированы с рядом заболеваний нервной системы и опорно-двигательного аппарата [1]. Каналы Na_v

являются мишенями для множества нейротоксинов разных организмов. В ПЧД и поре канала идентифицировано как минимум шесть рецепторных токсинсвязывающих сайтов [2]. Нейротоксины являются не только инструментами для структурно-функциональных исследований Na_v каналов, но также могут служить прообразами новых лекарств [3].

Длинные токсины скорпионов, действующие на каналы Na_v (NaTx), состоят из ~60–70 а.о. и имеют структурный мотив $\beta\alpha\beta\beta$, стабилизированный четырьмя дисульфидными связями (рис. 1б) [4]. По фармакологическим свойствам NaTx подразделяют на две большие группы. α -Токсины ингибируют инактивацию канала, связываясь с рецепторным сайтом 3, расположенным на внеклеточных петлях ПЧД DIV, а β -токсины способствуют активации канала, действуя на рецепторный сайт 4, расположенный на ПЧД DII.

Токсин Ts1 (также известный как TsVII или Ts- γ) является основным компонентом яда бразильского скорпиона *Tityus serrulatus* [5]. В настоящее время молекулярный механизм действия этого токсина остаётся малоизученным [6]. Токсин Ts1 с аффинностью в пикомолярном диапазоне действует на каналы Na_v насекомых и млекопитающих [7] и влияет не только

¹ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской Академии наук, Москва

² Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный Московской обл.

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

⁴ Catholic University of Leuven, Belgium

* E-mail: zakhar-shenkarev@yandex.ru

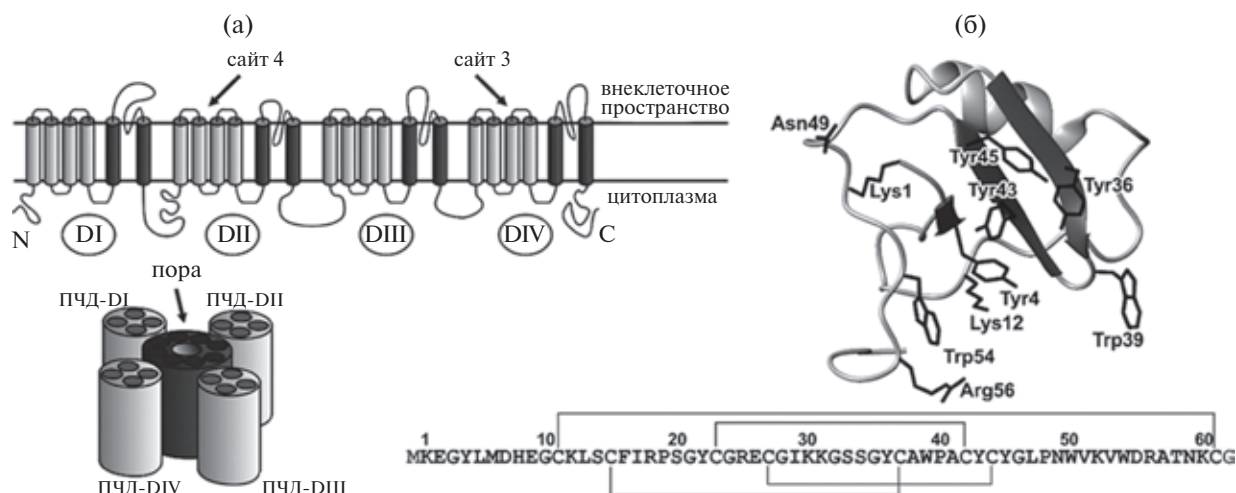


Рис. 1. Схематическое изображение пространственной организации α -субъединицы Na_v -каналов эукариот в мембране — (а). Пространственная структура токсина T1 (PDB ID: 1NPI [4]) и последовательность его аналога, использованная в работе — (б). Показаны а.о., вероятно, формирующие сайт связывания с ПЧД каналов Na_v , а также ароматический кластер на поверхности токсина. Серым выделены а.о., дополнительно введенные в последовательность токсина.

на активацию, но и на инактивацию каналов млекопитающих [8], возможно, взаимодействуя с ПЧД DII и с ПЧД DIV [9].

Молекула T1 гидрофобна и склонна к агрегации в водном растворе [6]. Согласно данным спектроскопии кругового дихроизма, токсин обладает высокой конформационной подвижностью в воде, что, вероятно, объясняет его способность взаимодействовать с разными молекулярными мишенями [10]. Эти свойства затрудняют очистку T1 из яда и рекомбинантную продукцию токсина. В 2014 г. впервые были описаны успешный химический синтез и ренатурация T1 [11], однако рекомбинантную продукцию функционального T1 так и не удалось осуществить.

В представленной работе мы впервые описываем рекомбинантную продукцию в клетках *Escherichia coli* токсина T1, содержащего С-концевой остаток Gly62 (рис. 16), и его ^{15}N -меченого аналога. Вариант токсина с Gly62 присутствует в природном яде наряду с основным компонентом, содержащим карбоксиамидную группу на С-конце ($\text{Cys61}-\text{CONH}_2$) [12].

Для продукции T1 мы сначала апробировали широко применяемый метод, основанный на экспрессии белка в виде слитной конструкции с тиоредоксином (TRX) [13, 14]. Для удаления TRX в конструкции был предусмотрен линкер, содержащий сайт гидролиза энтеропептидазой. Несмотря на оптимизацию условий рекомбинантной продукции (концентрация индуктора, температура и время культивирования клеток до и после индукции), получить изолированный препарат T1 не удалось.

Следующим подходом стала продукция T1 в виде цитоплазматических тел включения с последующей ренатурацией. Этот подход успешно применялся для продукции белков семейства Lyb/uPAR, содержащих 4–6 дисульфидных связей [15]. Тельца включения, содержащие T1, получали в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3), трансформированных вектором *pET-22b(+)/T1*, согласно опубликованному протоколу [15]. Для получения ^{15}N -меченого препарата T1 питательную среду перед индукцией меняли на минимальную, содержащую $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ в качестве единственного источника азота. Для увеличения эффективности очистки восстановленного T1 с помощью анионообменной хроматографии остатки Cys были химически модифицированы до S-сульфонатов ($\text{Cys}-\text{S}-\text{SO}_3^-$). Далее сульфогруппы отщепляли от белка с помощью избытка дитиотреитола и восстановленный T1 очищали методом ВЭЖХ.

Ренатурация восстановленного белка является ключевым этапом как при рекомбинантной продукции, так и при химическом синтезе белков [11, 15]. Для оптимизации условий ренатурации T1 варьировали состав буфера для ренатурации, а именно: pH, концентрацию восстановленной и окисленной форм глутатиона (GSH и GSSG), концентрацию мочевины, L-аргинина и целевого белка. Оптимальным оказался буфер следующего состава: 50 мМ Трис-HCl, 1,5 М мочевины, 0,5 М L-аргинин, 2 мМ GSH, 2 мМ GSSG, pH 8,0. Ренатурацию проводили в течение 3 сут при 4°C и концентрации белка, равной 0,01 мг/мл. Очистку целевого белка после ренатурации проводили с помощью ВЭЖХ.

Масс-спектрометрия и анализ ренатурированного Tsl с помощью реактива Элмана подтвердили полное замыкание дисульфидных связей в молекуле токсина. Однако анализ немеченого и ^{15}N -меченого препаратов токсина методом ЯМР-спектроскопии выявил присутствие в образцах значительной доли (до 50%) некорректно свёрнутого белка (рис. 2а). Корректно свёрнутый Tsl характеризовался большой дисперсией сигналов ^1H в спектре (от 9,5 до 7 м.д.), что свойственно белкам, содержащим β -структурные участки (рис. 2б). Сигналы некорректно свёрнутого белка наблюдали в области 8,2 м.д., что соответствует неупорядоченной структуре (рис. 2а). Вероятно, этот белок соответствует наиболее выгодному с энергетической точки зрения изомеру Tsl с неправильной схемой замыкания дисульфидных связей. Дополнительная очистка с помощью ВЭЖХ позволила выделить корректно свёрнутый изомер белка (рис. 2б). Выход свёрнутого Tsl составил 1,4 мг/л культуры.

Исследование методом двухэлектродной фиксации потенциала на каналах $\text{Na}_v1.4$ крысы и $\text{Na}_v1.5$ человека, экспрессированных в ооцитах лягушки *Xenopus laevis*, показало, что 1 мкМ Tsl вызывал уменьшение амплитуды тока ионов Na^+ через эти каналы на 10 и 30% соответственно (рис. 3а, в). Рекombинантный Tsl обладал меньшей активностью по сравнению с природным токсином [8], что ранее наблюдалось для природных и синтетических аналогов Tsl, не содержащих, как и в настоящей

работе, С-концевую карбоксиамидную группу [11, 12]. Токсин сдвигал кривую зависимости активации канала $\text{Na}_v1.4$ в сторону более отрицательных значений мембранного потенциала (облегчал активацию канала), что характерно для β -токсинов скорпионов, действующих на сайт 4 (рис. 3б). Этот сдвиг вызывает активацию канала при потенциале покоя. В случае канала $\text{Na}_v1.5$ рекombинантный Tsl так же, как и природный токсин, не влиял на процессы активации и инактивации (рис. 3г).

Разработанная в настоящей работе система рекombинантной продукции позволит в дальнейшем исследовать взаимодействие Tsl/ Na_v методами сайт-направленного мутагенеза, а также изучить функционально важную конформационную подвижность токсина методами ЯМР-спектроскопии.

Авторы выражают благодарность G. Mandel (Vollum Institute, Oregon Health & Science University, Portland, OR, USA), R. G. Kallen (Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA), S.H. Heinemann (Friedrich-Schiller-Universität Jena, Germany) и S.C. Cannon (David Geffen School of Medicine at University of California, Los Angeles, CA, USA) за предоставление генов $\text{hNa}_v1.5$, $\text{rNa}_v1.4$, $\text{r}\beta 1$ и $\text{h}\beta 1$.

Источник финансирования. Работа поддержана грантом РФФИ 16-14-10338 и программой Президиума Российской академии наук "Молекулярная и клеточная биология" (исследование функциональной активности препарата Tsl).

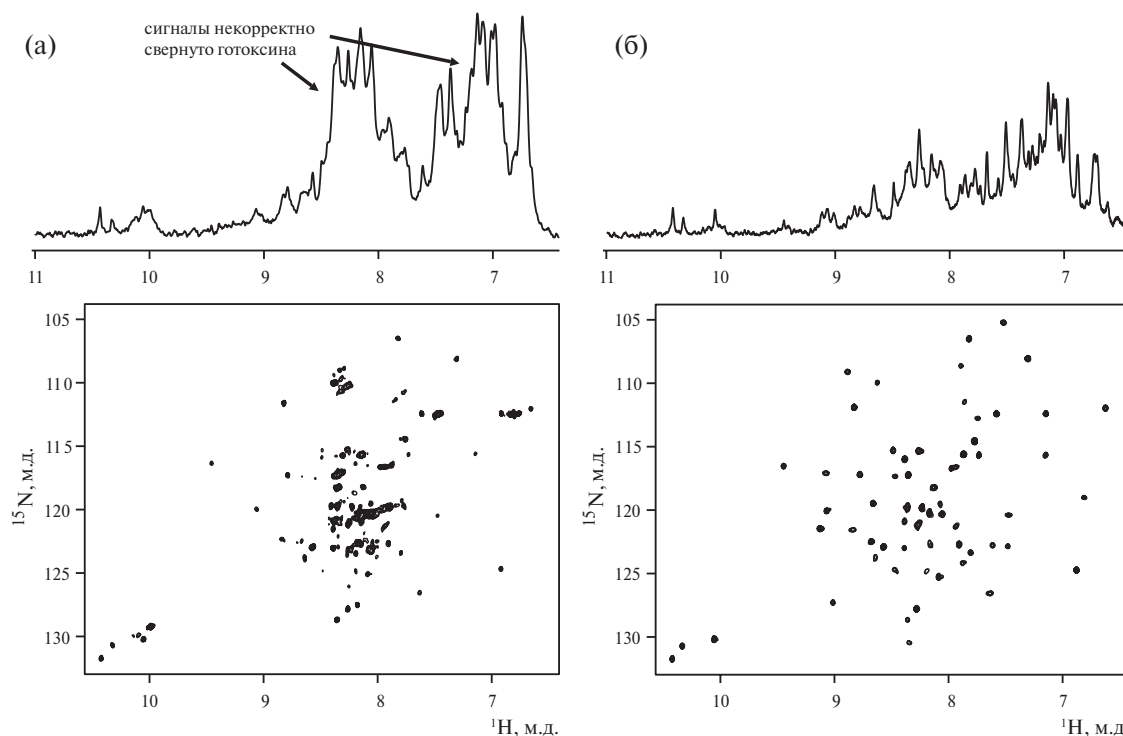


Рис. 2. Сравнение 1D ^1H и 2D ^1H - ^{15}N -HSQC ЯМР-спектров препаратов ^{15}N -меченого Tsl, содержащего примесь некорректно свёрнутого дисульфидного изомера (а), и после дополнительной очистки с помощью ВЭЖХ (б).

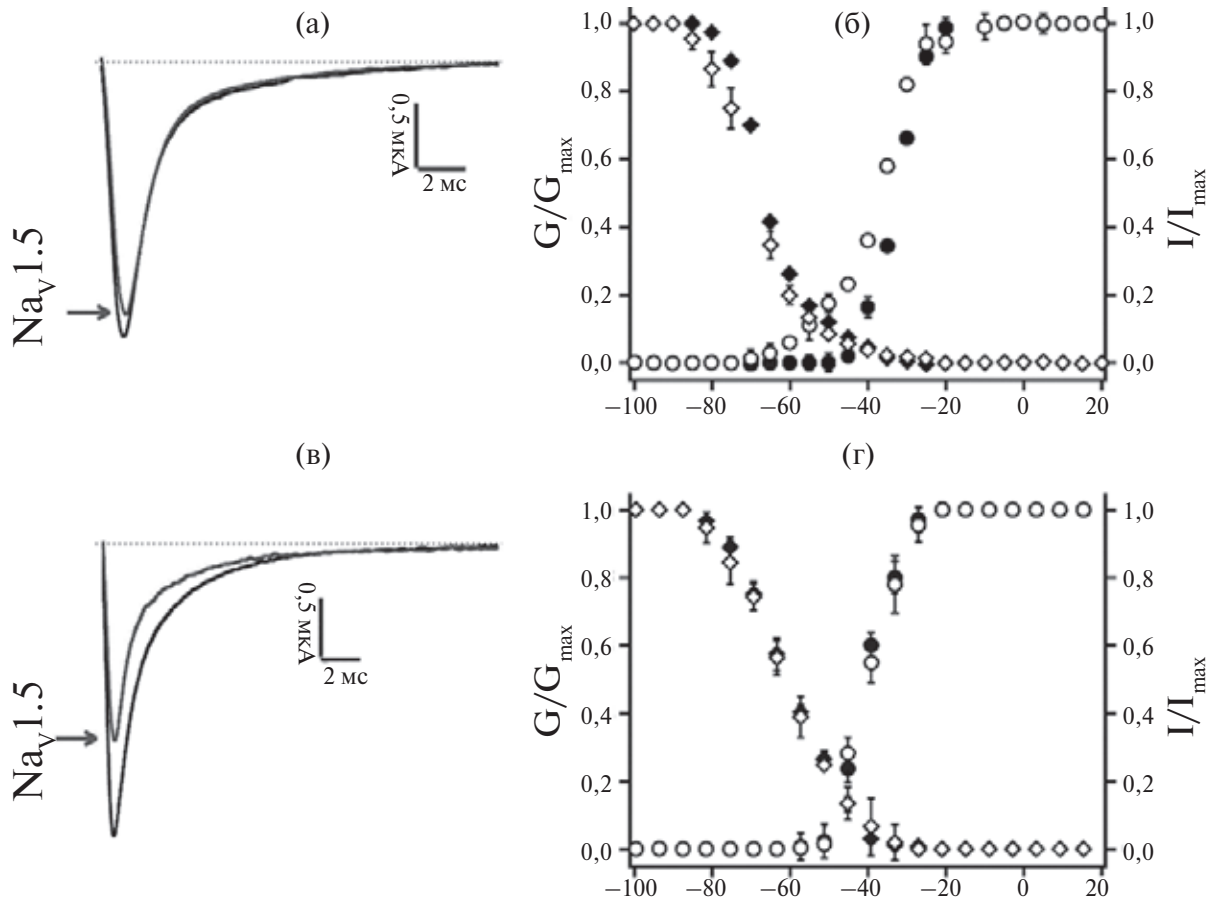


Рис. 3. Влияние рекомбинантного Ts1 на изоформы Na_v1.4 и Na_v1.5 Na⁺ каналов. (а, в) — токи, вызванные 100-миллисекундным скачком потенциала с -90 мВ до 0 мВ, показаны в отсутствие (выделено чёрным) и в присутствии 1 мкМ Ts1 (выделено серым и показано стрелкой). (б, г) — зависимость активации (\bullet/\circ) и стационарной инактивации ($\blacklozenge/\white\lozenge$) каналов от трансмембранного потенциала. Данные ($M \pm m, n = 5$), полученные в отсутствие и в присутствии 1 мкМ Ts1, показаны чёрными и белыми символами соответственно.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Catterall W.A. // J. Physiol. 2012. V. 590. P. 2577–2589.
- Stevens M., Peigneur S., Tytgat J. // Front. Pharmacol. 2011. V. 2. P. 71.
- Männikkö R., Shenkarev Z.O., Thor M.G., Berkut A.A., Myshkin M. Y., Paramonov A.S., Kulbatskii D.S., Kuzmin D.A., Sampedro Castaneda M., King L., Wilson E.R., Lyukmanova E.N., Kirpichnikov M.P., Schorge S., Bosmans F., Hanna M.G., Kullmann D. M., Vassilevski A. A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2018. V. 115. P. 4495–4500.
- Pinheiro C.B., Marangoni S., Toyama M.H. et al. // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2003. V. 59. P. 405–415.
- Barhanin J., Giglio J.R., Leopold P., et al. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. P. 12553–12558.
- Martin-Eauclaire M.F., Bougis P.E., de Lima M.E. // Toxicon. 2018. V. 152. P. 106–120.
- Bosmans F., Martin-Eauclaire M.F., Tytgat J. // Toxicol. Appl. Pharmacol. 2007. V. 218. P. 45–51.
- Peigneur S., Cologna C.T., Cremonez C.M., et al. // Neuropharmacology. 2015. V. 95. P. 269–277.
- Bosmans F., Martin-Eauclaire M.F., Swartz K.J. // Nature 2008. V. 456. P. 202–208.
- Loret E.P., Sampieri F., Roussel A., et al. // Proteins: Struct., Funct., Bioinf. 1990. V. 8. P. 164–172.
- Dang B., Kubota T., Correa A.M., et al. // Angew. Chem. Int. Ed. 2014. V. 53. P. 8970–8974.
- Coelho V.A., Cremonez C.M., Anjolette F.A., et al. // Toxicon. 2014. V. 83. P. 15–21.
- Люкманова Е.Н., Шулепко М.А., Шенкарев З.О., Долгих Д.А., Курпичников М.П. // Биоорг. химия. 2010. Т. 36. № 2. С. 149–158.
- Pluzhnikov K., Vassilevski A., Korolkova Y., Fisyunov A., Iegorova O., Krishtal O, Grishin E. // Toxicon. 2007. V. 50. № 7. P. 993–1004.
- Shulepko M.A., Lyukmanova E.N., Shenkarev Z.O., Dubovskii P.V., Astapova M.V., Feofanov A.V., Arseniev A.S., Utikin Y.N., Kirpichnikov M.P., Dolgikh D.A. // Protein Expr. Purif. 2017. V. 130. P. 13–20.

**RECOMBINANT PRODUCTION
AND STRUCTURE-FUNCTION STUDY OF Ts1 TOXIN
FROM THE BRAZILIAN SCORPION *Tityus serrulatus***

**Z. O. Shenkarev, M. A. Shulepko, S. Peigneur, M. Yu. Myshkin, A. A. Berkut,
A. A. Vassilevski, J. Tytgat, E. N. Lyukmanova, Academician of the RAS M. P. Kirpichnikov**

Received August 15, 2018

This work introduces an effective bacterial system for the production of β -toxin Ts1, the main component of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* venom. Recombinant toxin and its ^{15}N -labeled analogue are obtained by direct expression of the synthetic gene in *Escherichia coli*, with subsequent folding from the inclusion bodies. NMR spectroscopy data assert that the recombinant toxin is structured in aqueous solution and is composed of a significant fraction of β -structure. Moreover, the formation of a stable Ts1 disulfide-bond isomer of a disordered structure is observed during folding; recombinant Ts1 blocks Na^+ current through $\text{Na}_v1.5$ channels, without affecting the processes of activation and inactivation. Simultaneously, the effect upon $\text{Na}_v1.4$ channels is associated with a shift of the activation curve toward the more negative membrane potentials.

Keywords: protein refolding, ligand-receptor interactions, NMR spectroscopy, sodium channels, scorpion β -toxins.