



УДК 577.112.083 577.215

ТРЕХПЕТЕЛЬНЫЕ ТОКСИНЫ ГАДЮК – КЛОНИРОВАНИЕ кДНК И ЭКСПРЕССИЯ В *E. coli* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХИМЕРНОЙ (ГИБРИДНОЙ) КОНСТРУКЦИИ С БЕЛКОМ-ПАРТНЕРОМ SUMO

© 2025 г. Д. А. Сухов*, ***, Л. О. Оджомоко*, И. В. Шелухина*, М. В. Владыкина*,
В. Ю. Кост***, Р. Х. Зиганшин*, О. В. Гераськина****, С. В. Баландин*,
Т. В. Овчинникова*, В. И. Цетлин*, Ю. Н. Уткин*, #

* ФГБУН ГНЦ “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

** МИРЭА – Российский технологический университет, Россия, 119571 Москва, просп. Вернадского, 86

*** Институт Вейцмана, отдел химической и структурной биологии, Израиль, 7610001 Реховот, ул. Герцля, 234
**** Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, 1с12

Поступила в редакцию 10.06.2025 г.

После доработки 18.06.2025 г.

Принята к публикации 19.06.2025 г.

Трехпетельные токсины (ТПТ) образуют одно из наиболее обширных семейств токсинов змеиных ядов. ТПТ характерны для большинства ядов аспид, но практически не встречаются в ядах гадюк. С использованием ядовитых желез гадюк *Vipera nikolskii* и *V. berus* был получен 21 клон кДНК, кодирующий эту группу токсинов. Из полученных последовательностей кДНК были выведены аминокислотные последовательности 9 ТПТ. Установленные последовательности имеют сигнальные пептиды, содержащие 19–21 аминокислотный остаток, за которыми следует зрелый белок, состоящий из 67 остатков. Все ТПТ гадюк относятся к группе нетрадиционных (non-conventional) токсинов, а их последовательности содержат 9 остатков цистеина. ТПТ, кодируемый одним из транскриптов, был получен гетерологической экспрессией в клетках *E. coli* в виде гибридного белка с растительным белком-搭档ом SUMO с последующим отщеплением специфичной растительной протеазой Bd-SENP1 и хроматографической очисткой. Структура полученного белка подтверждена методом масс-спектрометрии. Анализ его биологической активности показал, что этот токсин – слабый антагонист никотиновых холинорецепторов нейронного $\alpha 7$ и $\alpha 3\beta 2$ подтипов. С использованием гибридного белка с SUMO мы также попытались получить ТПТ Aze-2 гадюки *Azemiops feae*, аминокислотная последовательность которого была установлена нами ранее в результате транскриптомного анализа ядовитой железы *A. feae*, а сам белок в минимальных количествах был идентифицирован в яде этой змеи. Однако токсин, точно соответствующий по массе Aze-2, с использованием этого подхода получить не удалось. Таким образом, в результате работы были установлены аминокислотные последовательности 9 ТПТ гадюк, один из которых был получен экспрессией гена в клетках *E. coli* и проявил способность взаимодействовать с никотиновыми холинорецепторами нейронного $\alpha 7$ и $\alpha 3\beta 2$ подтипов.

Ключевые слова: трехпетельные токсины, клонирование, экспрессия, SUMO, масс-спектрометрия, никотиновый холинорецептор

DOI: 10.31857/S0132342325050089

ВВЕДЕНИЕ

Трехпетельные токсины (ТПТ, three-finger toxins в английской версии) – обширное суперсемейство токсинов, не обладающих ферментативной актив-

ностью [1]. ТПТ – один из основных компонентов яда аспидов, т.е. змей семейства *Elapidae* (например, кобры, морских змей, кraitов, мамб, коралловых змей и др.), и практически не встречаются в ядах гадюк. Они включают несколько структурных ти-

Сокращения: Сокращения: КД – круговой дихроизм; нХР – никотиновый холинорецептор; ТПТ – трехпетельный токсин.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 336-65-22; эл. почта: yutkin@yandex.ru).

пов токсинов, проявляющих различные виды биологической активности. Наиболее распространенные – цитотоксины (или кардиотоксины) и α -нейротоксины. Цитотоксины неспецифически взаимодействуют с клеточными мембранами, нарушая их структуру и вызывая таким образом гибель клеток. Их аминокислотные последовательности содержат 60–62 аминокислотных остатка, включая 8 остатков цистеина, которые образуют 4 дисульфидные связи [2]. α -Нейротоксины – блокаторы никотиновых холинорецепторов (нХР) разных подтипов. В настоящее время известны два типа α -нейротоксинов: длинноцепочечные белки, такие как α -бунгартоксин или α -кобротоксин (до 75 аминокислотных остатков, 5 дисульфидных связей, одна из которых находится в центральной петле токсина), с сопоставимой эффективностью ингибирующие мышечные и нейронные (α 7, α 8 и α 9/ α 10) нХР, а также короткие α -нейротоксины (до 62 остатков, 4 дисульфида), ингибирующие только нХР мышечного типа. Ряд подтипов нейронных рецепторов находятся и вне нервной системы, например, на клетках иммунной системы. Существуют и другие, менее распространенные типы ТПТ, такие как, например, фасцикулины, ингибирующие ацетилхолинэстеразу, димерные κ -бунгартоксины, ингибирующие некоторые подтипы нейронных нХР. Следует также упомянуть так называемые нетрадиционные (non-conventional) токсины, аминокислотные последовательности которых содержат 62–82 остатка и 5 дисульфидных связей, одна из которых находится в N -концевой полипептидной петле ТПТ [3]. Как уже отмечалось, ТПТ присутствуют в основном в ядах аспидов, однако в последнее время целый ряд таких токсинов был идентифицирован в ядах змей семейства *Colubridae* [4, 5]. Интересно, что все идентифицированные ТПТ *Colubridae* относятся к нетрадиционным токсинам.

Ранее считалось, что яды змей семейства *Viperidae* (гадюковых) не содержат ТПТ. Однако проведенные в последнее время исследования показали, что это не так. Первоначально нуклеотидные последовательности, кодирующие ТПТ были обнаружены при транскриптомном анализе ядовитых желез бушмейстера *Lachesis muta* [6] и карликовой гремучей змеи *Sistrurus catenatus edwardsii* [7]. Позднее ТПТ были идентифицированы в ядах обыкновенной жаарааки *Bothrops jararaca* [8], бирманской гадюки *Azemiops feae* [9], а также западноафриканской ковровой гадюки *Echis ocellatus* и шумящей гадюки *Bitis arietans* [10]. Однако содержание ТПТ в ядах гадюк крайне мало, поэтому ни один из них не был выделен из яда в индивидуальном состоянии. Вследствие этого

биологическая активность этих токсинов практически не исследована.

В данной работе при анализе ядовитых желез гадюк *Vipera nikolskii* и *V. berus* нами получен 21 клон кДНК, кодирующий ТПТ. Из полученных последовательностей кДНК были выведены аминокислотные последовательности 9 ТПТ. Однако проведенный ранее протеомный анализ ядов нескольких гадюк рода *Vipera* не обнаружил в них присутствия ТПТ [11]. Широко распространенным подходом к получению низко представленных белков с целью их детального изучения служит гетерологическая экспрессия. Ранее мы использовали этот подход для получения ТПТ гадюк экспрессией в *E. coli* генов, кодирующих последовательности зрелых токсинов [12]. При этом белки получались в виде телец включения, что приводило к необходимости проводить ренатурацию. Учитывая тот факт, что аминокислотные последовательности токсинов содержали 9–10 остатков цистеина, этот процесс проходил не всегда однозначно вследствие образования продуктов с различным замыканием дисульфидных связей. Кроме того, к аминокислотной последовательности токсина добавлялся *N*-концевой остаток метионина, что могло вызывать изменения в структуре и активности токсина. Чтобы избежать этих проблем, мы решили использовать экспрессию токсинов в виде химерных белков, способствующих правильной сборке экспрессируемых молекул. Из нескольких часто используемых белков-партнеров мы выбрали SUMO. Присоединение SUMO к *N*-концевому остатку плохо экспрессируемых белков значительно усиливает их экспрессию в *E. coli*. С высокой специфичностью расщеплять химерные белки с SUMO способны дрожжевая Ulp1 [13, 14] и растительная bdSENP1 [15] протеазы. Для облегчения последующей хроматографической очистки белка аминокислотные последовательности токсина и SUMO, дополнили последовательностью гистидинового тэга. Мы использовали этот подход для получения двух ТПТ гадюк. Исследование биологической активности одного из полученных токсинов показало, что он является слабым антагонистом нХР нейронного α 7 и α 3 β 2 подтипов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клонирование и секвенирование кДНК из ядовитых желез гадюк. Тотальную РНК выделяли из ядовитых желез нескольких экземпляров гадюк *V. nikolskii* и *V. berus*. Для клонирования кДНК использовали метод ПЦР со ступенчатым понижением температуры (“Step-down”) на стадии отжига праймеров. При этом праймеры были аналогичны

таковым, использованным в работе [16] для клонирования кДНК, кодирующей ТПТ в ядовитой железе карликовой медноголовой змеи *Austrelaps labialis*. В результате получили продукты амплификации, содержащие фрагменты кДНК размером около 300 п.н. Всего был секвенирован 21 клон: 6 клонов из железы *V. nikolskii* и 15 клонов из железы *V. berus* (табл. 1).

На основании нуклеотидных последовательностей этих клонов было выведено 9 различ-

Таблица 1. Число клонов кДНК, полученных из ядовитых желез *V. nikolskii* и *V. berus*

№ последовательности токсина (рис. 1)	Число клонов		
	<i>V. nikolskii</i>	<i>V. berus</i>	всего
1	2	5	7
2	2	0	2
3	1	6	7
4	1	2	3
5	0	1	1
6	0	1	1
7	0	1	1
8	0	1	1
9	0	1	1

ных аминокислотных последовательностей ТПТ (рис. 1). Установленные последовательности имеют сигнальные пептиды, содержащие 19–21 аминокислотный остаток, за которым следует зрелый белок, состоящий из 67 остатков. Все ТПТ гадюк относятся к группе нетрадиционных (non-conventional) токсинов, из них 8 последовательностей содержат 9 остатков цистеина, а одна 8 остатков (ТПТ7, рис. 1).

Отсутствие остатка цистеина в установленных нами последовательностях в положении 59 (и 60 в ТПТ 7) может приводить к невозможности

образования С-концевой полипептидной петли и формирования трехпетельной структуры, что, в свою очередь, может вызывать снижение биологической активности токсина. Ранее было показано, что неправильное замыкание дисульфидных связей в С-концевом участке ТПТ кобротоксина приводило к снижению его токсичности [17]. Тем не менее нужно отметить, что последовательности ТПТ, содержащие замену цистеина в положении 59 на тирозин, были идентифицированы при транскриптомном анализе ядовитых желез нескольких змей, включая бумсланга *Dispholidus typus* [18], древесную змею *Thrasops jacksonii* [18], травянисто-зеленую плетевидку *Ahaetulla prasina* [19] и амазонскую раздувающуюся змею *Spilotes sulphureus* [20]. Примечательно, что все эти виды относятся к семейству *Colubridae*. ТПТ с такой заменой не идентифицированы в ядах и их биологическая активность не известна. Есть, правда, одно исключение: в нашей предыдущей работе [12] экспрессией синтетического гена в *E. coli* был получен токсин, соответствующий последовательности ТПТ2 без сигнального пептида (рис. 1), и было установлено, что он в микромолярном диапазоне концентраций ингибирировал нНР мышечного типа, а также и нейронного типа, содержащего $\alpha 3$ субъединицу. Однако, поскольку токсин был получен прямой экспрессией гена, он содержал N-концевой остаток метионина. Кроме того, было не ясно в каком состоянии находится остаток цистеина 47, который должен был бы образовать дисульфидную связь с остатком цистеина в положении 59, замененном в ТПТ2 на тирозин. Учитывая эти факты, мы решили получить рекомбинантный токсин, содержащий остаток цистеина 59 и не содержащий N-концевого остатка метионина. Аминокислотная последовательность этого токсина, названного VN-3FT, соответствует последовательности ТПТ2 без сигнального пептида и с заменой остатка тирозина в положении 59 на цистein (рис. 1).

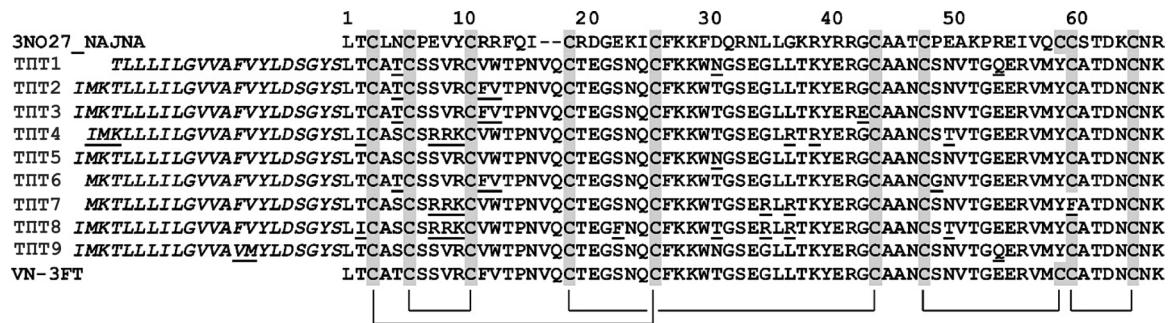


Рис. 1. Аминокислотные последовательности ТПТ гадюк, выведенные на основании нуклеотидных последовательностей кДНК. Курсивом показаны сигнальные пептиды. Подчеркнуты аминокислотные остатки, отличающиеся в ТПТ. 3NO27_NAJNA – типичный нетрадиционный токсин кобры *Naja naja* (идентификатор в базе данных Uniprot KB – P29181). VN-3FT – аминокислотная последовательность ТПТ2 без сигнального пептида и с заменой остатка тирозина в положении 59 на цистеин. Линиями указаны положения дисульфидных связей в природных нетрадиционных токсинах.

Получение рекомбинантных ТПТ экспрессией химерных генов в *E. coli*. Для получения рекомбинантных ТПТ синтезировали гены, кодирующие химерный белок, включающий ТПТ, к *N*-концевой α -аминогруппе которого присоединен белок-партнер SUMO. В качестве белка-партнера был выбран SUMO растения *Brachypodium distachyon* (код доступа в базе данных Uniprot KB I1HUL5) для последующего использования протеазы BdSENP1 также растительного происхождения. Как было показано ранее, такая комбинация обеспечивает расщепление белка с высокой специфичностью, а растительная протеаза сохраняет активность при высокой концентрации солей [15]. Для облегчения хроматографической очистки полученного белка к *N*-концевой аминогруппе SUMO добавили гистидиновый тэг (рис. 2).

Оптимизацию кодонов для *E. coli* проводили с учетом частоты встречаемости кодонов в этом организме [21]. Последовательность гена дополнительно корректировали, минимизируя количество

GC-богатых участков, но сохраняя идентичность аминокислотных остатков. Ген химерного белка клонировали в вектор pET-28. Для экспрессии рекомбинантного гена штамм-реципиент *E. coli* BL21 (DE3) был трансформирован рекомбинантной плазмидой, содержащей ген химерного белка. После индукции экспрессии и накопления биомассы, содержащей рекомбинантный белок, клетки лизировали с использованием ультразвукового дезинтегратора в неденатурирующем буфере, содержащем 1 M NaCl, и осаждали нерастворимый осадок центрифугированием. Полученный супернатант наносили на никельсодержащий сорбент и после промывки элюировали буфером, содержащим 250 mM имидазол. Элюат анализировали методом электрофореза в 12% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) (рис. 3). Белок, элюирующийся 250 mM имидазолом с никельсодержащего носителя, имеет молекулярную массу около 20 кДа, величина которой близка расчетной средней массе химерного белка 19076 Да.

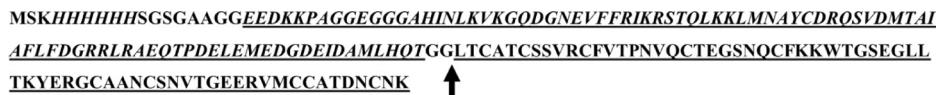


Рис. 2. Аминокислотная последовательность химерного белка. Курсивом выделен гистидиновый тэг, подчеркнутым курсивом обозначена последовательность SUMO, последовательность VN-3FT подчеркнута. Стрелка указывает место расщепления протеазой BdSENP1.

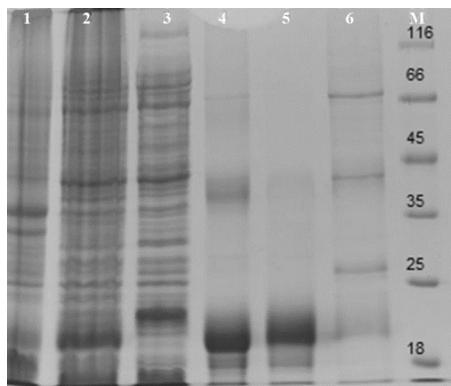


Рис. 3. Анализ продуктов экспрессии химерного гена методом электрофореза в 12% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Окрашивание Кумаси голубым (Coomassie brilliant blue R-250). 1 – нерастворимая фракция клеточного белка; 2 – растворимая фракция; 3 – продукты, не связавшиеся с сорбентом Ni-NTA; 4 – продукты, элюирующиеся 250 mM имидазолом; 5 – продукты, не связавшиеся с Q Sepharose 6 High Performance; 6 – продукты, связавшиеся с Q Sepharose 6 High Performance; M – набор стандартных белков, числа указывают молекулярные массы белков в кДа.

После удаления имидазола диализом раствор химерного белка (рис. 3, дорожка 4) наносили на анионообменный сорбент Q Sepharose 6 High Performance. Целевой продукт с данным сорбентом не связывается (рис. 3, дорожка 5), однако связываются примесные соединения (рис. 3, дорожка 6). Не связавшийся химерный продукт диализовали, добавляли высокоспецифичную протеазу BdSENP1 и инкубировали 20 ч. Полученный после протеолиза токсин очищали от 6His-SUMO-тэга с использованием металл-аффинной хроматографии и дополнительно с применением ранее использовавшейся анионообменной смолы, с которой токсин не связывался. Целевой продукт, не связавшийся с металл-аффинным и анионообменным сорбентами, диализовали против ацетатного буфера с pH 3.75. После диализа полученный белок наносили на катионообменный сорбент SP Sepharose 6 High Performance и элюировали буфером с высокой ионной силой, содержащим 0.5 M NaCl.

На последней стадии токсин подвергали очистке с помощью обращено-фазовой хроматографии (рис. 4). Полученные фракции анализировали далее методом масс-спектрометрии и определяли их биологическую активность.

С использованием аналогичного подхода был сконструирован химерный белок, в который вместо VN-3FT встраивали другой нетрадиционный токсин – Aze-2. Аминокислотная последовательность этого токсина была установлена при транскриптомном анализе ядовитой железы гадюки *A. ferae*, а сам токсин был обнаружен в следовых количествах в яде этой змеи [9]. Амино-

кислотная последовательность Aze-2 содержит 67 аминокислотных остатков, из которых 10 – остатки цистеина (рис. 5).

Интересная особенность аминокислотной последовательности Aze-2 заключается в наличии остатка тирозина между 8 и 9 остатками цистеина, при этом положение остатка тирозина 59 совпадает в Aze-2 и ТПТ2 (рис. 5). Aze-2 получали аналогично тому, как это было сделано для VN-3FT. На последней стадии белок также подвергали очистке методом обращено-фазовой хроматографии (рис. 6).

Однако полученные результаты были не столь однозначны. Обычно, чтобы достигнуть оптимального разделения и не перегружать хроматографическую колонку, выделение проводится несколькими порциями. Хроматографические профили при этом, как правило, отличаются незначительно. Однако при выделении разных партий Aze-2 хроматограммы существенно отличались (рис. 6a, b), а пик, соответствующий токсину, был широким и неоднородным (рис. 6a), что говорит о присутствии в исследуемой пробе смеси различных продуктов. Отметим, что подобная картина наблюдалась при получении рекомбинантного длинноцепочечного α -нейротоксина rLcNTx змей семейства *Elapidae* экспрессией в клетках *E. coli* его синтетического гена, кодирующего консенсусную аминокислотную последовательность токсина [22]. Наличие нескольких фракций авторы объясняли образованием структурных изоформ,

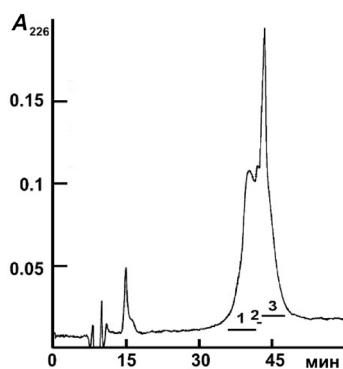


Рис. 4. Выделение VN-3FT методом обращено-фазовой хроматографии на колонке Jupiter C18 (10×250 мм) в градиенте концентрации ацетонитрила в воде от 15 до 45% за 60 мин в присутствии 0.1% трифтормукусной кислоты. Скорость потока 2 мл/мин. Горизонтальные линии отмечают собранные фракции.

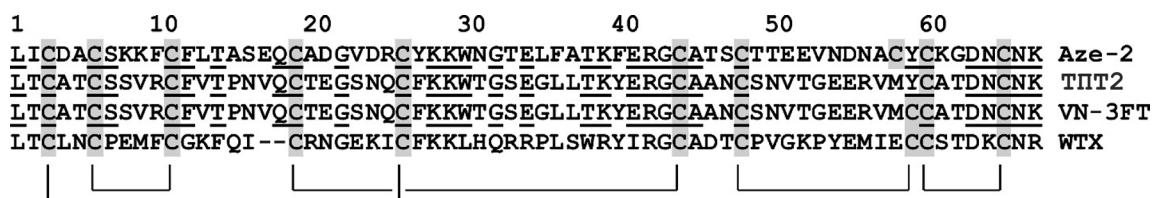


Рис. 5. Аминокислотные последовательности токсинов Aze-2, ТПТ2, VN-3FT и нетрадиционного токсина WTX из яда кобры *Naja kaouthia* (UniProt No P82935). Линиями указаны положения дисульфидных связей в природных нетрадиционных токсинах.

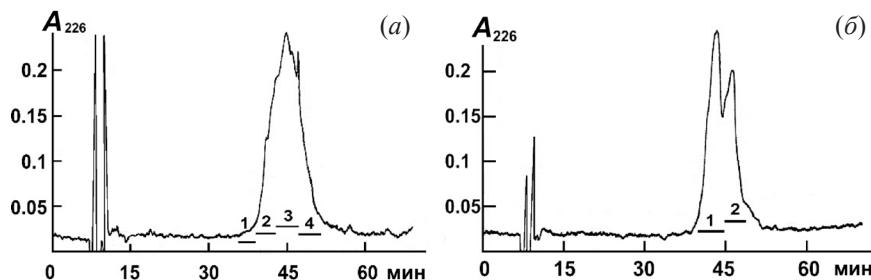


Рис. 6. Выделение Aze-2 методом обращено-фазовой хроматографии на колонке Jupiter C18 (10×250 мм) в градиенте концентрации ацетонитрила в воде от 15 до 45% за 60 мин в присутствии 0.1% трифтормукусной кислоты. Скорость потока 2 мл/мин. Горизонтальные линии отмечают собранные фракции. (a, б) – разделение разных партий токсина.

то есть белков с различным случайным замыканием дисульфидных мостиков. Возможно, то же самое происходит при получении Aze-2, причем структурные изоформы неустойчивы и между ними происходит постоянный обмен. Фракции, обозначенные на рис. 4 и 6, подвергали дальнейшему анализу методами масс-спектрометрии высокого разрешения и спектроскопии кругового дихроизма.

Анализ структуры полученных токсинов методом масс-спектрометрии высокого разрешения. Для анализа структуры полученных токсинов использовали масс-спектрометрию высокого разрешения. При анализе фракций VN-3FT (рис. 4) установлено, что молекулярная масса токсина из фракции 3 (7238.20 Да) в пределах ошибки измерения соответствует теоретической массе (7238.16 Да), рассчитанной на основании аминокислотной последовательности. Для подтверждения правильности аминокислотной последовательности белок восстанавливали с помощью три(2-карбоксиэтил)fosфина, карбамидометилировали 2-хлорацетамидом, гидролизовали трипсином и анализировали полученные пептиды методом жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией. Проведенный анализ показал, что полученный нами токсин полностью соответствует аминокислотной последовательности VN-3FT (рис. 7a).

Масс-спектрометрический анализ фракций 3 и 4 (рис. 6a), полученных при разделении одной из порций Aze-2 показал, что они содержат белок с массой 7433.17 Да, дающий наиболее интенсивный сигнал в масс-спектрах и белки с

большими массами (7509.18 Да и более), дающие менее интенсивные сигналы. Однако все они отличаются по массе от Aze-2, имеющего расчетную массу 7438.23 Да. Масс-спектры фракций 1 и 2 (рис. 6б) практически идентичны и содержат интенсивный сигнал, соответствующий молекулярной массе 7435.16 Да, и целый ряд менее интенсивных сигналов, превышающих эту массу на 31, 75, 108 и более Да. И в этой партии токсина измеренная молекулярная масса (7435.16 Да) меньше расчетной (7438.23 Да). Присутствие сигналов, соответствующих более высоким массам, можно объяснить частичной модификацией аминокислотных остатков в процессе получения Aze-2. Анализ пептидов, полученных в результате трипсинолиза, показал наличие таких модификаций как окисление остатка триптофана, дезамидирование остатков аспарagine и глутамина, ацетилирование N-концевой α -аминогруппы (рис. 7б).

Анализ вторичной структуры полученных токсинов методом спектроскопии кругового дихроизма. Структура ТПТ характеризуется высоким содержанием β -складчатых слоев и β -изгибов, что проявляется в характерных спектрах кругового дихроизма (КД) [23]. В данной работе методом КД анализировали структуры VN-3FT (рис. 4, фракция 3) и Aze-2 (рис. 6б, фракция 1), а также для сравнения регистрировали спектр нетрадиционного токсина WTX (рис. 8). Для анализа спектров применяли инструменты онлайн сервиса BeStSel [24], поскольку этот алгоритм наиболее аккуратно предсказывает различные типы β -конформаций полипептидной цепи [25]. Полученные спектры очень похожи на спектры ТПТ,

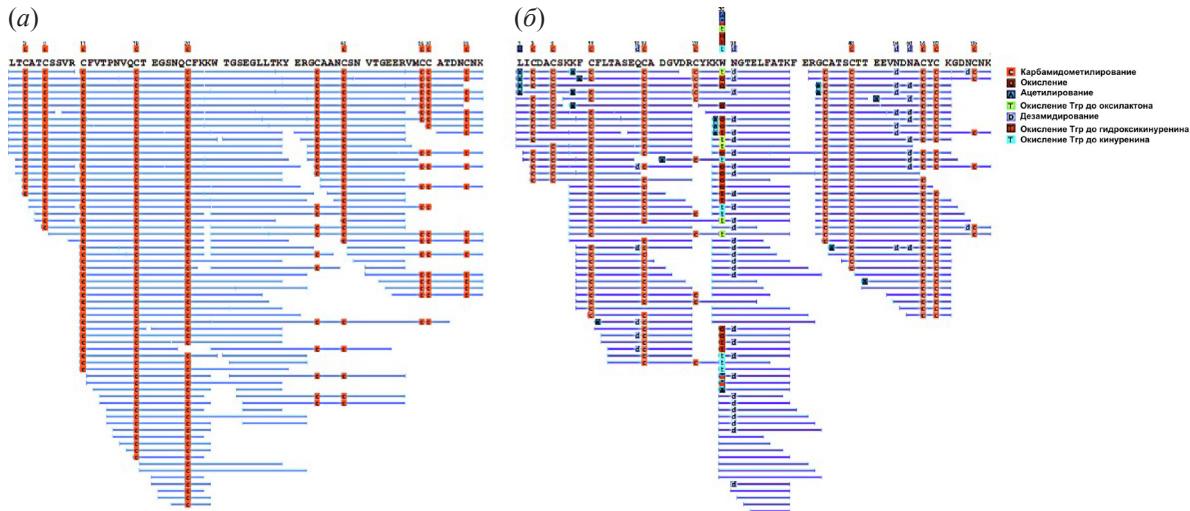


Рис. 7. Аминокислотные последовательности VN-3FT (a) и Aze-2 (б) и соответствующие им пептиды, обнаруженные в гидролизатах полученных токсинов (показаны горизонтальными линиями).



Рис. 8. Спектры КД токсинов в 50 мМ натрий-фосфатном буферо, рН 7.5.

описанные ранее [23, 26]. Анализируемые токсины обладают сходной вторичной структурой, содержащей более 50% β -структур, из которой около 40% составляют антипараллельные β -листы (табл. 2). При этом α -спиральная структура не обнаружена, а наибольший процент неупорядоченной структуры наблюдается у Aze-2 (табл. 2).

Основываясь на данных спектроскопии КД, можно заключить, что вторичная структура полученных нами токсинов в целом соответствует таковой ТПТ, в которой преобладают антипараллельные β -листы.

Анализ биологической активности VN-3FT. Как уже указывалось, VN-3FT и Aze-2 относятся к классу нетрадиционных токсинов. Ранее нами было показано, что токсин WTX, относящийся к этому классу, ингибиравал некоторые нХР нейронного типа [27]. Для определения биологической активности полученного в данной работе токсина VN-3FT использовали те же методы, что и в цитируемой статье [27]. Для изучения взаимодействия VN-3FT с $\alpha 3\beta 2$ подтипа нХР человека были проведены электрофизиологические эксперименты (рис. 9). Обнаружено, что VN-3FT в концентрации 10 мкМ ингибиравал примерно на 30% ток, вызываемый 50 мкМ ацетилхолином в $\alpha 3\beta 2$ подтипе нХР (рис. 9). Аналогичное ингибиравание этого подтипа рецептора наблюдалось при действии токсина WTX [27]. Отмывка токсина ТПТ буфером в течение 5 мин лишь незначительно восстановила активность рецептора. Таким образом, VN-3FT – плохо обратимый слабый антагонист $\alpha 3\beta 2$ подтипа нХР человека.

Ингибиравание функциональной активности $\alpha 7$ нХР человека анализировали с помощью кальциевого имиджинга. Эксперименты проводились

на клетках нейробластомы человека SH-SY5Y, которые, как известно, экспрессируют $\alpha 7$, а также $\alpha 3$ -содержащие нХР. Для активации только $\alpha 7$ нХР использовали его специфический агонист PNU282987 (400 нМ) в присутствии положительного аллостерического модулятора PNU120596 (10 мкМ). При этом установлено, что VN-3FT ингибиравает повышение внутриклеточной концентрации кальция, вызванное PNU282987 в клет-

Таблица 2. Содержание вторичной структуры в токсинах, установленное методом спектроскопии КД

Вторичная структура	Токсин		
	WTX	VN-3FT	Aze-2
Антипараллельный β -лист, %	43.9	39.3	37.0
β -Изгиб, %	12.3	14.7	14.8
α -Спираль, %	0	0	0
Неупорядоченная, %	43.8	46.1	48.2
RMSD ¹	0.0616	0.0353	0.0395
NRMSD ²	0.0165	0.0188	0.0234

¹ Среднеквадратичное отклонение.

² Нормализованное среднеквадратичное отклонение.

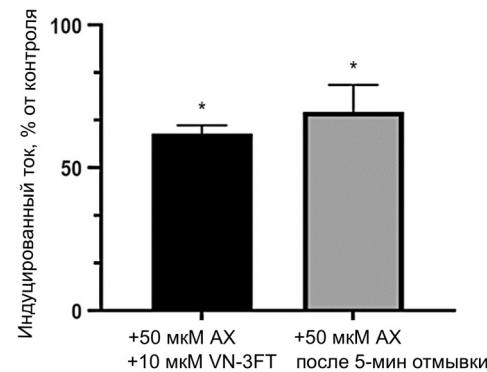


Рис. 9. Ингибиравание токсином VN-3FT токов, индуцируемых ацетилхолином в нХР $\alpha 3\beta 2$ типа. Регистрировали ответ ооцита, экспрессирующего $\alpha 3\beta 2$ нХР, на 50 мкМ ацетилхолина без добавления токсина (100%), после 1 мин инкубации с 10 мкМ VN-3FT и после отмычки VN-3FT в течение 5 мин. Приведены средние значения амплитуды токов \pm среднеквадратическое отклонение. N = 3. *p < 0.05, t-тест Стьюдента, сравнение с контрольными значениями.

ках SH-SY5Y (рис. 10). При использовании концентраций VN-3FT в диапазоне от 2.5 до 10 мкМ амплитуда клеточных ответов снижалась на 14–19% по сравнению с контрольными значениями. Примерно такая же ингибирующая активность наблюдалась ранее и для токсина WTX [27].

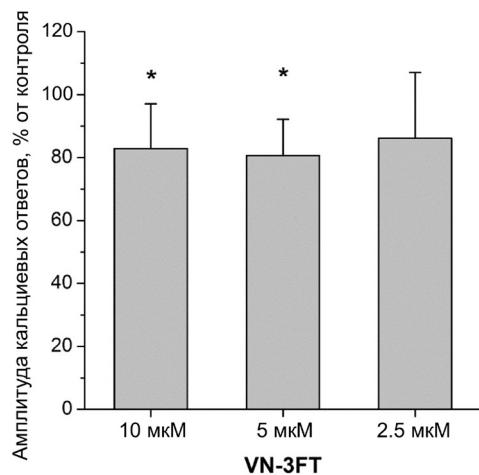


Рис. 10. Анализ методом кальциевого имиджинга ингибирования клеточных ответов нейробластомы SH-SY5Y человека, вызванных активацией α_7 nHR с помощью агониста PNU282987 (400 нМ) в присутствии положительного аллостерического модулятора PNU120596 (10 мкМ), различными концентрациями VN-3FT (30 мин). Приведены средние значения амплитуды кальциевых ответов \pm среднеквадратическое отклонение. N = 3. * $p < 0.05$, t-тест Стьюдента, сравнение с контрольными значениями.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. Синтез олигонуклеотидов и нуклеотидной последовательности генов был выполнен компанией Евроген (Москва, Россия).

Культивирование рекомбинантных штаммов продуцентов *E. coli* проводили в ферментере компании Биотехно (Россия) вместимостью 15 л с объемом питательной среды 10 л. Очистку целевого препарата проводили с использованием хроматографической системы среднего давления Unique GS AutoPure 50 (Good Science Instrument Technology Co., Ltd, Китай). В работе использовались хроматографические колонки компании Cytiva (США) и аффинные и ионообменные сорбенты компаний Bio-Works (Швеция) и Galak (Китай), соответственно.

Все использованные в работе реактивы имели чистоту “ч.д.а.” или выше.

Выделение тотальной РНК. Для получения ядовитых желез змей умерщвляли путем декапитации и препарировали железы. Их немедленно замораживали в жидком азоте и хранили в морозильной камере при температуре -70°C . Перед выделением тотальной РНК железы гомогенизировали в жидком азоте. Неповрежденную полную РНК выделяли с помощью системы SV Total RNA Isolation System (Promega Corporation, Мэдисон, Висконсин, США) в соответствии с процедурой, рекомендованной производителем [28].

Обратная транскрипция и ОТ-ПЦР. Однокепочечная ДНК была приготовлена из общей РНК (1 мкг) с использованием обратной транскриптазы (Promega) и поли-Т-праймера (T30). Два ген-специфичных праймера были выбраны на основе праймеров из статьи [18]. Последовательность смыслового праймера –ATGAAAAC-CTGCTGTTGATCCTGGGGGT, а антисмыслового праймера – GCCAATAGTCACTTTAGAACTA-TTTGTTGCAGTTGTCTG.

Для ступенчатой ПЦР использовали следующий профиль термического цикла: 95°C в течение 60 с, 35 циклов по 94°C в течение 30 с, отжиг при $65-53^{\circ}\text{C}$ в течение 40 с (после каждого пяти циклов температура отжига снижалась на 2°C) и элонгация при 68°C в течение 20 с. В последнем цикле время элонгации увеличилось до двух минут для лучшего клонирования в Т-векторе. Продукты разделяли электрофорезом в 1.5% агарозном геле, окрашенном бромидом этидия.

Клонирование и секвенирование кДНК. Основные продукты ПЦР элюировали из агарозного геля, используя набор DNA Extraction kit (Fermentas, США) и лигировали в вектор pGEM-T (Promega) по липким концам. Трансформировали компетентные клетки *E. coli* (штамм DH-10B, Life Technologies, Gaithersburg, MD, США). Конструкции со вставками отбирали при помощи синебелой селекции и методом ПЦР, используя праймеры векторов M13. Минипрепартивное выделение плазмидной ДНК осуществлялось с использованием метода щелочного лизиса [29]. Анализ нуклеотидной последовательности продуктов проводили методом терминации дидезоксициприди с использованием метода терминатора флуоресцентной метки и автоматического секвенатора ABI PRISM 3100-Avant (Applied Biosystems, США).

Получение токсинов. Для получения штаммов-продуцентов токсинов компетентные клетки *E. coli* BL21(DE3) трансформировали рекомбинантными плазмидами pET28-6His-SUMO-

VN-3FT и pET28-6His-SUMO-Aze2. Оба трансформированных штамма выращивали в течение ночи при 37°C в среде LB, содержащей NaCl (10 г/л), триптон (10 г/л) и дрожжевой экстракт (5 г/л), с добавлением канамицина 50 мкг/мл. Затем культуру пересевали в свежую порцию среды LB с антибиотиком и инкубировали в шейкере (225 об/мин) при 37°C в течение ночи. На следующий день полученную культуру разбавляли средой LB, дополненной 2.5 mM MgCl₂, и выращивали в биореакторе F25L (БИОТЕХНО, Россия) при 37°C, 400 об/мин, 0.6 бар и 0.25 м³/ч до экспоненциальной фазы, определяемой по достижению оптической плотности 0.9 при 600 нм. Затем температуру снижали до 20°C, и добавляли изопропил β-D-1-тиогалактопиранозид (IPTG) до конечной концентрации 1 mM. Через 20 ч после индукции клетки собирали центрифугированием при 4500 об/мин в центрифуге Beckman Coulter Avanti™ J-15R, оснащенной ротором Beckman Coulter Avanti™ JS-4.750 (Beckman Coulter, США).

Биомассу бактерий (30 г), экспрессирующих целевой рекомбинантный продукт, сусpendировали в 5-кратном объеме буферного раствора Ni-A (50 mM NaH₂PO₄; 1M NaCl; 0.1% Tween-20, pH = 7.5), содержащего 1 mM фенилметилсульфонилфторид (PMSF) и проводили лизис с использованием ультразвукового дезинтегратора Q500 (Qsonica; США) при амплитуде 60, импульс вкл/выкл 05/05 с в течение 10 мин на льду. Лизат осветляли центрифугированием на центрифуге HERMLE Z-36HK, оснащенной ротором HERMLE 12/035 (HERMLE Labortechnik GmbH, Германия), при 21 000 об/мин в течение 40 мин. Осветленный лизат пропускали через мембранный фильтр из полизэфирсульфона с размером пор 0.22 мкм (Techno Plastic Products (TPP), Швейцария).

Отфильтрованный продукт наносили на хроматографическую колонку HiScale 16/10 (Cytiva, США) с 5 мл сорбента Ni-NTA (Bio-Works, Швеция). Колонку предварительно уравновешивали, пропустив 50 мл буфера Ni-A (скорость элюции 3 мл/мин), наносили продукт, после чего промывали колонку 50 мл буфера Ni-A. Для десорбции продукта использовали 25 мл буфера Ni-B (50 mM NaH₂PO₄; 50 mM NaCl; 0.1% Tween-20; 250 mM имидазол, pH = 7.5). Фракции, содержащие рекомбинантный целевой продукт, объединяли и диализовали против буфера Q-A (50 mM Трис-HCl; 180 mM NaCl, 0.1% Tween-20, 1 mM дитиотреит, pH 8.0) при соотношении объемов 1 : 40 в течение 16 ч. Для анионообменной хроматографии использовали колонку HiScale™ 16/10, заполненную 3 мл Q Sepharose 6 High Performance (Galak, Китай) и

предварительно уравновешенную 30 мл буфера Q-A. Отфильтрованный диализат наносили на колонку со скоростью 2 мл/мин. Не связавшийся химерный продукт объединяли и диализовали против следующего буфера: 50 mM Трис-HCl; 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20; 5 mM дитиотреит, pH 8.0 при соотношении объемов 1 : 40 в течение 16 ч. После диализа к препарату добавляли рекомбинантную растительную протеазу BdSENP1 (приготовление будет опубликовано отдельно) в соотношении 1 : 200 (фермент : субстрат) по массе. Протеолиз проводили при температуре 25°C в течение 20 ч.

Полученный после протеолиза белок очищали от 6HIS-SUMO-тэга и примесных соединений с использованием металло-аффинной и анионообменной хроматографии, как описано выше. Затем не связавшийся препарат диализовали против буфера SpA (20 mM ацетат натрия pH 3.75) в соотношении 1 : 40 и наносили на катионообменный сорбент SP Sepharose 6 High Performance и элюировали буфером SpB (20 mM ацетат натрия, 500 mM NaCl pH 3.75). Полученный препарат диализовали против буфера: 5 mM Непес-На, 2 mM KCl, 96 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ pH 7.5 – в соотношении 1 : 40 двукратно в течение 20 ч.

Aze-2 получали аналогично с использованием описанной выше процедуры.

После диализа токсины подвергали дополнительной очистке с использованием обращенофазовой ВЭЖХ. Хроматографию проводили на колонке Jupiter C18 (10 × 250 мм, Phenomenex, Torrance, CA, USA) в градиенте концентрации ацетонитрила от 15 до 45% за 60 мин в присутствии 0.1% трифтормукусной кислоты. Скорость элюции 2 мл/мин. Профили разделения представлены на рис. 4 и 6.

Масс-спектрометрия высокого разрешения. Масс-спектрометрический анализ проводили как описано ранее [30].

Восстановление, алкилирование и гидролиз белков трипсином. Навеску токсина растворяли в восстанавливающем и алкилирующем буфере pH 8.5 так, чтобы финальная концентрация белка, Трис, дезоксихолата натрия, Трис(2-карбоксиэтил)fosфина и 2-хлороацетамида была 1 мг/мл, 100 mM, 1%, 10 и 20 mM, соответственно. Раствор белков прогревали при 95°C в течение 10 мин, охлаждали до комнатной температуры и добавляли равный объем трипсина (Promega, США) в 100 mM Трис pH 8.5 в весовом соотношении 1 : 100. После инкубации в течение ночи при 37°C раствор триптических пептидов подкис-

ляли ТФУ до конечной концентрации 1%, экстрагировали образовавшийся осадок дезоксихлоревой кислоты в равный объем этилацетата при бурном перемешивании, разделяли этилацетат и водную фазу центрифугированием (15 000г, 2 мин), этилацетат отбирали и отбрасывали. Процедуру экстракции повторяли трижды. Пептиды обессоливали на микроколонках StageTips, как было описано ранее [31, 32], с небольшими модификациями. Микроколонки для обессоливания пептидов изготавливали из наконечников для автоматических пипеток (200 мкл) и мембранны Empore SDB-RPS (3М). Для обессоливания 20 мкг триптического гидролизата использовали 1 микроколонку с двумя кусочками мембранны, вырезанными иглой диаметром G14 (2.108 мм). Пептиды наносили на микроколонку центрифугированием при 200г в течение ~ 6 мин, промывали смесью, состоящей из 100 мкл 1% ТФУ и 100 мкл этилацетата, 100 мкл 1% ТФУ, 100 мкл 0.2% ТФУ и элюировали 60 мкл раствора, содержащего 5% гидроксида аммония и 40% ацетонитрила. Элюат высушивали на центрифужном вакуумном испарителе досуха и хранили до хромато-масс-спектрометрического анализа при –85°C.

Хромато-масс-спектрометрический анализ пептидов. Высушенный элюат растворяли в 20 мкл водного раствора, содержащего 2% ацетонитрила и 0.1% ТФУ, и 3 мкл наносили на колонку (диаметр 75 мкм, длина 25 см) с сорбентом Aeris Peptide XB-C18 2.6 мкм (Phenomenex, США). Разделение пептидов проводили на хроматографической системе Ultimate 3000 Nano LC System (Thermo Fisher Scientific, США), сопряженной с масс-спектрометром Q Exactive HF (Thermo Fisher Scientific) посредством наноэлектроспрейного источника (Thermo Fisher Scientific). Пептиды загружали на термостатируемую при 40°C колонку в буфере А (0.2% муравьиная кислота (FA) в воде) и элюировали с нее линейным 120 мин градиентом 4–55% буфера Б (0.1% FA, 19.9% вода, 80% ацетонитрила) при скорости потока 350 нл/мин. После каждого градиента колонку промывали 95% буфера Б в течение 5 мин и уравновешивали буфером А в течение 5 мин. Масс-спектрометрические данные сохраняли при автоматическом переключении между MS1 сканированием и вплоть до 15 MS/MS сканирований (метод topN). Целевое значение для MS1 сканирования было выставлено 3×10^6 в диапазоне 300–1.200 m/z с максимальным временем инжектирования ионов 60 мсек и разрешением 60000. Изолирование ионов-прекурсоров осуществляли при ширине окна 1.4 m/z и фиксированной первой массе 100.0 m/z . Ионы-прекурсоры фрагментировали методом высокозенергетической диссоциации в ловушке C-trap с нормализованной

энергией столкновения 28 eV. MS/MS сканы сохраняли с разрешением 15000 при m/z 400 и при значении 1×10^5 для целевых ионов в диапазоне 200–2000 m/z с максимальным временем инжекции ионов 30 мсек.

Анализ хромато-масс-спектрометрических данных. Анализ аминокислотных последовательностей токсинов и их пост-трансляционных модификаций проводили с использованием компьютерной программы PEAKS Studio 8.0 build 20160908 [33]. Первичные структуры пептидов, генерируемые этой программой, анализировали, сравнивая с аминокислотными последовательностями VN-3FT и Aze-2. Допустимый уровень ложноположительных идентификаций (FDR) пептидов был установлен на 0.01 и определялся путем корреляции массива MS/MS данных с реверсной базой данных белковых последовательностей, которая генерировалась программой PEAKS Studio. Идентификацию пептидов осуществляли при допустимом начальном отклонении массы иона-прекурсора до 10 ppm и допустимом отклонении массы фрагментов 0.05 Да.

Спектроскопия КД. Спектры КД пептидов в диапазоне 190–250 нм с шагом 0.2 нм регистрировали с помощью спектрополяриметра Jasco-810 (Jasco, Япония) с использованием разборной кварцевой кюветы с толщиной оптического слоя 0.1 мм (Jasco, Япония). Спектры корректировали вычитанием базовой линии (50 мМ натрий-фосфатный буфер pH 7.5). Для анализа спектров применяли инструменты онлайн сервиса BeSTSel [24], поскольку этот алгоритм наиболее аккуратно предсказывает различные типы β-слойных конформаций полипептидной цепи [25].

Электрофизиологические измерения. Электрофизиологические измерения на ооцитах *Xenopus* проводили, как описано в [34]. Различные концентрации VN-3FT предварительно инкубировали с ооцитами в течение 1 мин, затем добавляли 50 мкМ ацетилхолин и регистрировали ответ. Максимальный ток, полученный в ответ на 50 мкМ ацетилхолин без добавления токсина, принимали за 100%.

Анализ биологической активности методом кальциевого имиджинга. Анализ проводили с использованием клеток нейробластомы человека SH-SY5Y, которые активировали с помощью агониста PNU282987 (400 нМ) в присутствии положительного аллостерического модулятора PNU120596 (10 мкМ), как описано в работе [27]. Максимальный ответ, полученный без добавления токсинов, принимали за 100%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием ядовитых желез гадюк *V. nikolskii* и *V. berus* получен 21 клон кДНК, кодирующий ТПТ. Из этих последовательностей кДНК были выведены аминокислотные последовательности 9 ТПТ. Каждая из них содержит *N*-концевой сигнальный пептид размером 19–21 аминокислотных остатков, за которым следует зрелый белок, состоящий из 67 остатков. Все ТПТ гадюк относятся к группе нетрадиционных токсинов, а их последовательности содержат 9 остатков цистеина, за исключением ТПТ7, в последовательности которого имеется 8 остатков цистеина. VN-3FT, рекомбинантный аналог природного токсина ТПТ2, кодируемого одним из транскриптов, был получен гетерологической экспрессией в клетках *E. coli* в виде гибридного белка с растительным белком-партнером SUMO с последующим его расщеплением специфичной протеазой BdSENP1 и хроматографической очисткой. Структура полученного белка подтверждена методом масс-спектрометрии. Анализ его биологической активности показал, что этот токсин выступает слабым антагонистом нНР нейронного $\alpha 7$ и $\alpha 3\beta 2$ подтипов. Аналогичный подход с использованием гибридного белка с SUMO использовали для получения ТПТ Aze-2 гадюки *A. feae*, аминокислотная последовательность которого была установлена нами ранее в результате транскриптомного анализа ядовитой железы *A. feae*, а сам белок в минимальных количествах был идентифицирован в яде этой змеи. Однако молекулярная масса полученного рекомбинантного токсина отличалась от расчетного значения, соответствующего природному Aze-2. Таким образом, в результате работы были установлены аминокислотные последовательности 9 ТПТ гадюк, один из которых был получен экспрессией гена в клетках *E. coli* и проявил способность взаимодействовать с никотиновыми холинорецепторами нейронного $\alpha 7$ и $\alpha 3\beta 2$ подтипов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Т. В. Андреевой за помощь при очистке рекомбинантных токсинов.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках Государственного задания (№ 124051400034-0).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей в качестве объектов исследования. Информированное согласие не требовалось.

Все процедуры со змеями одобрены Институтской комиссией по содержанию и использованию лабораторных животных Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук. Протокол-заявка № 324/2021 от 23 июня 2021 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Utkin Y., Sunagar K., Jackson T.N., Reeks T., Fry B.G. // In *Venomous Reptiles and Their Toxins: Evolution, Pathophysiology and Biodiscovery*. Ed. Fry B.G. New York: Oxford University Press, 2015. P. 215–227.
2. Dubovskii P.V., Utkin Y.N. // *Toxins* (Basel). 2024. V. 16. P. 262. <https://doi.org/10.3390/toxins16060262>
3. Nirthanam S., Gopalakrishnakone P., Gwee M.C., Khoo H.E., Kini R.M. // *Toxicon*. 2003. V. 41. P. 397–407. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(02\)00388-4](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(02)00388-4)
4. Heyborne W.H., Mackessy S.P. // *Toxicon*. 2021. V. 190. P. 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.12.002>
5. Srodnawa K., Cerdá P.A., Davis Rabosky A.R., Crowe-Riddell J.M. // *Toxins* (Basel). 2023. V. 15. P. 523. <https://doi.org/10.3390/toxins15090523>
6. Junqueira-de-Azevedo I.L., Ching A.T., Carvalho E., Faria F., Nishiyama M.Y. Jr., Ho P.L., Diniz M.R. // *Genetics*. 2006. V. 173. P. 877–889. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.056515>
7. Pahari S., Mackessy S.P., Kini R.M. // *BMC Mol. Biol.* 2007. V. 8. P. 115. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-8-115>
8. Nicolau C.A., Carvalho P.C., Junqueira-de-Azevedo I.L., Teixeira-Ferreira A., Junqueira M., Perales J., Neves-Ferreira A.G., Valente R.H. // *J. Proteomics*. 2017. V. 151. P. 214–231. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.06.029>
9. Babenko V.V., Ziganshin R.H., Weise C., Dyachenko I., Shaykhutdinova E., Murashev A.N., Zhmak M., Starkov V., Hoang A.N., Tsetlin V., Utkin Y. // *Biomedicines*. 2020. V. 8. P. 249. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8080249>

10. Dingwoke E.J., Adamude F.A., Mohamed G., Klein A., Salihu A., Abubakar M.S., Sallau A.B. // Biochem. Biophys. Rep. 2021. V. 28. P. 101164. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.101164>
11. Kovalchuk S.I., Ziganshin R.H., Starkov V.G., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. // Toxins (Basel). 2016. V. 8. P. 105. <https://doi.org/10.3390/toxins8040105>
12. Makarova Y.V., Kryukova E.V., Shelukhina I.V., Lebedev D.S., Andreeva T.V., Ryazantsev D.Y., Balandin S.V., Ovchinnikova T.V., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. // Dokl. Biochem. Biophys. 2018. V. 479. P. 127–130. <https://doi.org/10.1134/S1607672918020205>
13. Malakhov M.P., Mattern M.R., Malakhova O.A., Drinker M., Weeks S.D., Butt T.R. // J. Struct. Funct. Genomic. 2004. V. 5. P. 75–86. <https://doi.org/10.1023/B:JSFG.0000029237.70316.52>
14. Kuo D., Nie M., Courey A.J. // Methods Mol. Biol. 2014. V. 1177. P. 71–80. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1034-2_6
15. Frey S., Görlich D. // J. Chromatogr. A. 2014. V. 1337. P. 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.029>
16. Doley R., Tram N.N., Reza M.A., Kini R.M. // BMC Evol. Biol. 2008. V. 8. P. 70. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-70>
17. Chang L.S., Lin S.R., Chang C.C. // Arch. Biochem. Biophys. 1998. V. 354. P. 1–8. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0660>
18. Fry B.G., Scheib H., van der Weerd L., Young B., McNaughtan J., Ramjan S.F., Vidal N., Poelmann R.E., Norman J.A. // Mol. Cell Proteomics. 2008. V. 7. P. 215–246. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700094-MCP200>
19. Modahl C.M., Mackessy S.P. // PLoS Negl. Trop. Dis. 2016. V. 10. P. e0004587. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004587>
20. Modahl C.M., Mrinalini, Frietze S., Mackessy S.P. // Proc. Biol. Sci. 2018. V. 285. P. 20181003. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.1003>
21. Escherichia coli [gbct]: 8087 CDS's (2330943 codons) // Codon Usage Database. <https://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=37762>
22. Carpanta V., Clement H., Arenas I., Corzo G. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2024. V. 732. P. 150420. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2024.150420>
23. Drake A.F., Dufton M.J., Hider R.C. // Eur. J. Biochem. 1980. V. 105. P. 623–630. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1980.tb04540.x>
24. Micsonai A., Wien F., Kernya L., Lee Y.H., Goto Y., Réfrégiers M., Kardos J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2015. V. 112. P. E3095–E3103. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500851112>
25. Micsonai A., Moussong É., Wien F., Boros E., Vadászi H., Murvai N., Lee Y.H., Molnár T., Réfrégiers M., Goto Y., Tantos Á., Kardos J. // Nucleic Acids Res. 2022. V. 50(W1). P. W90–W98. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac345>
26. Feofanov A.V., Sharonov G.V., Dubinnyi M.A., Astapova M.V., Kudelina I.A., Dubovskii P.V., Rodionov D.I., Utkin Y.N., Arseniev A.S. // Biochemistry (Moscow). 2004. V. 69. P. 1148–1157. <https://doi.org/10.1023/b:biry.0000046890.46901.7e>
27. Severyukhina M.S., Ojomoko L.O., Shelukhina I.V., Kudryavtsev D.S., Kryukova E.V., Epifanova L.A., Denisova D.A., Averin A.S., Ismailova A.M., Shaykhutdinova E.R., Dyachenko I.A., Egorova N.S., Murashev A.N., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. // Int. J. Biol. Macromol. 2025. V. 288. P. 138626. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.138626>
28. Otto P., Kephart D., Bitner R., Huber S., Volkerding K. // Promega Notes. 1998. V. 69. P. 19–23.
29. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
30. Ryabinin V.V., Ziganshin R.H., Starkov V.G., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 107–121. <https://doi.org/10.1134/S1068162019020109>
31. Rappaport J., Mann M., Ishihama Y. // Nat. Protoc. 2007. V. 2. P. 1896–1906. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.261>
32. Geyer P.E., Kulak N.A., Pichler G., Holdt L.M., Teupser D., Mann M. // Cell Syst. 2016. V. 2. P. 185–195. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2016.01.002>
33. Ma B., Zhang K., Hendrie C., Liang C., Li M., Doherty-Kirby A., Lajoie G. // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2003. V. 17. P. 2337–2342. <https://doi.org/10.1002/rem.1198>
34. Lebedev D.S., Kryukova E.V., Ivanov I.A., Egorova N.S., Timofeev N.D., Spirova E.N., Tufanova E.Y., Siniavin A.E., Kudryavtsev D.S., Kasheverov I.E., Zouridakis M., Katsarava R., Zavradashvili N., Iagorshvili I., Tzartos S.J., Tsetlin V.I. // Mol. Pharmacol. 2019. V. 96. P. 664–673. <https://doi.org/10.1124/mol.119.117713>

Three-Finger Viper Toxins – cDNA Cloning and Expression in *E. coli* Using a Chimeric (Hybrid) Construction with a Partner Protein SUMO

D. A. Sukhov^{*, **}, L. O. Ojomoko^{*}, I. V. Shelukhina^{*}, M. V. Vladykina^{*}, V. Yu. Kost^{***},
R. Kh. Ziganshin^{*}, O. V. Geraskina^{****}, S. V. Balandin^{*}, T. V. Ovchinnikova^{*},
V. I. Tsetlin^{*}, and Yu. N. Utkin^{*, #}

[#]Phone: +7 (495) 336-65-22; fax: +7 (495) 336-65-22; e-mail: utkin@ibch.ru; yutkin@yandex.ru

^{*}Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997 Russia

^{**}MIREA – Russian Technological University, prosp. Vernadskogo, 78, Moscow, 119454 Russia

^{***}Weizmann Institute of Science, Department of Chemical and Structural Biology,
st. Herzl, 234, POB 26, Rehovot, 7610001 Israel

^{****}Faculty of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University,
Leninskie Gory, 1/12, Moscow, 119234 Russia

Three-finger toxins (TFTs) form one of the most abundant families of toxins in snake venoms. TFTs are common for most Elapid venoms, but are almost never found in viper venoms. Using the venom glands of the vipers *Vipera nikolskii* and *V. berus*, 21 cDNA clones encoding this group of toxins were obtained. The amino acid sequences of 9 TFTs were deduced from the obtained cDNA sequences. The identified sequences have signal peptides containing 19–21 amino acid residues, followed by a mature protein consisting of 67 residues. All viper TFTs belong to the group of non-conventional toxins, and their sequences contain 9 cysteine residues. The TFT encoded by one of the transcripts was obtained by heterologous expression in *E. coli* cells as a fusion protein with the plant partner protein SUMO, followed by cleavage with the specific plant protease BdSEN P1 and chromatographic purification. The structure of the obtained protein was confirmed by mass spectrometry. Analysis of its biological activity showed that this toxin is a weak antagonist of nicotinic acetylcholine receptors of the neuronal $\alpha 7$ and $\alpha 3\beta 2$ subtypes. Using the fusion protein with SUMO, we also attempted to obtain the TFT Aze-2 of the viper *Azemiops feae*, the amino acid sequence of which was previously established by us as a result of transcriptome analysis of the venom gland of *A. feae*, and the protein itself was identified in minimal quantities in the venom of this snake. However, a toxin exactly corresponding in mass to Aze-2 could not be obtained using this approach. Thus, as a result of the work, the amino acid sequences of 9 viper TFTs were established, one of which was obtained by gene expression in *E. coli* cells and showed the ability to interact with nicotinic acetylcholine receptors of the neuronal $\alpha 7$ and $\alpha 3\beta 2$ subtypes.

Keywords: three-finger toxins, cloning, expression, SUMO, mass spectrometry, nicotinic acetylcholine receptor