

На правах рукописи

Сачкова Мария Юрьевна

**Двудоменные токсины ядов пауков**  
Специальность 02.00.10 – Биоорганическая химия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва – 2014

Работа выполнена в лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)

**Научный руководитель:**

кандидат химических наук **Василевский Александр Александрович**

**Официальные оппоненты:**

**Сергиев Петр Владимирович**, доктор химических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, химический факультет, кафедра химии природных соединений.

**Артамонова Ирена Игоревна**, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, отдел вычислительной биологии, старший научный сотрудник.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН)

Защита состоится в 10 ч 25 июня 2014 г. на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБХ РАН, а также на официальном сайте Института по адресу <http://www.ibch.ru>.

Автореферат разослан 20 мая 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор физико-математических наук



В.А. Олейников

## Общая характеристика работы

### Актуальность проблемы

Широко известно, что пауки продуцируют яд, состоящий из смеси мощных и селективных токсинов, каждый из которых может иметь свою специфическую биологическую активность. С одной стороны, яд пауков – фактор, несомненно, сыгравший одну из ключевых ролей в эволюции этих беспозвоночных, с другой – он является источником веществ, имеющих важное прикладное значение в качестве возможных лекарственных препаратов или инструментов изучения нервной системы. Эти аргументы обуславливают актуальность исследования разнообразия токсинов пауков. Однако лишь несколько видов, представляющих собой небольшую долю известного биоразнообразия, были изучены подробно, поэтому наше представление о репертуаре токсинов из яда пауков очень ограничено.

Пептидная составляющая наиболее представлена в яде всех изученных видов. Пептиды могут быть двух типов. (А) Нейротоксины обычно богаты дисульфидными связями и в пространстве формируют структуру «цистинового узла» (ICK – от англ. inhibitory cysteine knot). По-другому такие токсины называют ноттинами (от англ. knottin). (Б) Цитотоксины обычно являются линейными пептидами, приобретающими  $\alpha$ -спиральную конформацию при взаимодействии с липидными мембранами. Их также часто называют антимикробными пептидами (AMP, от англ. antimicrobial peptide) в связи с тем, что они активны против микроорганизмов.

Разнообразие компонентов яда является эволюционным преимуществом пауков, поэтому они «стремятся» его повышать. Это приводит к формированию так называемых «комбинаторных библиотек» токсинов: яд содержит группы гомологичных пептидов, аминокислотные последовательности которых вариабельны, а общие структурные мотивы консервативны. Однако известны и другие механизмы повышения разнообразия пептидных компонентов яда. Например, существуют дисульфид-богатые токсины с другими типами пространственной укладки. Относительно недавно в яде нескольких пауков были найдены токсины, состоящие из двух модулей (или доменов), каждый из которых соответствует «обычному» токсину. К началу работы над этой диссертацией были известны следующие комбинации доменов: (а) два ICK домена в составе одного токсина, (б) ICK домен с линейным С-концевым модулем, обладающим мембранной активностью, (в) два коротких линейных AMP, объединенные в одну молекулу. В принципе, возможен и четвертый вариант комбинации доменов – N-концевой домен типа AMP и С-концевой домен типа ICK. Двудоменные токсины изучены недостаточно. Так с одной стороны, неизвестны функ-

циональные роли отдельных модулей большинства токсинов, а с другой, механизмы их молекулярной эволюции.

### **Цель и задачи работы**

Целью данной работы было изучение разнообразия двудоменных (модульных) токсинов пауков. Были поставлены следующие задачи:

1. Поиск новых двудоменных токсинов пауков.
2. Изучение структуры и биологической активности модульных токсинов.
3. Определение структуры генов, кодирующих двудоменные токсины пауков.
4. Выяснение механизмов молекулярной эволюции модульных токсинов.

### **Научная новизна работы**

Впервые обнаружен новый класс двудоменных токсинов пауков, состоящих из линейного и ноттинового доменов – спайдеринов. Они были выделены из яда *Oxyopes takobius*, а затем обнаружены также и у *Oxyopes lineatus* (семейство Oxyopidae). Всего было установлено 20 аминокислотных последовательностей спайдеринов, подразделяемых на две группы. Эти токсины обладают мощной цитолитической, антимикробной и инсектицидной активностью, обусловленной линейным доменом.

В яде паука *Cheiracanthium punctorium* (семейство Miturgidae) было обнаружено широкое разнообразие модульных токсинов, построенных из двух ноттиновых доменов (CpTx-подобные токсины). Они подразделяются на четыре группы на основании сходства первичной структуры. Полные аминокислотные последовательности были определены для 12 полипептидов. CpTx-подобные токсины обладают высокой инсектицидной активностью.

Были проведены структурно-функциональные исследования цитоинсектотоксина 1a из яда паука *Lachesana tarabaevi*, состоящего из двух модулей, каждый из которых склонен к формированию амфипатической  $\alpha$ -спирали. Показано, что действие каждого из модулей в отдельности значительно слабее, чем у полноразмерного полипептида. Предположено, что при взаимодействии с бактериальными мембранами С-концевой домен выступает в роли «энхансера» для N-концевого, причем для активности полноразмерного токсина необходим ковалентный комплекс его модулей. В случае с мембранами насекомых важна длина полипептида.

Впервые исследована структура генов двудоменных токсинов. Установлено, что у пауков *O. lineatus* и *C. punctorium* они не содержат интронов. Анализ возможных механизмов молекулярной эволюции модульных токсинов показал, что на них воздействует отрицательный отбор. В ходе эволюции гены модульных токсинов образовались из генов однодоменных токсинов. Спайдерины, скорее всего, появились в результате «вставки»

линейного N-концевого домена в «предковый» дисульфид-богатый токсин между пропептидом и зрелым пептидом. Возможно, линейный домен появился благодаря превращению интрона, располагавшегося в гене однодоменного токсина, в кодирующую последовательность. СрТх-подобные токсины являются результатом «объединения» двух ноттиновых токсинов, последовательности которых проявляют умеренное сходство друг с другом.

### **Практическая ценность работы**

Исследуемые в работе спайдерин и цитоинсектотоксины обладают мощной антимикробной активностью, что делает их потенциальными антибиотиками. Все рассматриваемые токсины являются инсектицидными веществами, поэтому возможно их применение в сельском хозяйстве для борьбы с вредителями. Была разработана система получения рекомбинантных спайдеринов, что позволяет начать разработку биотехнологических методов их производства. Двудоменные токсины построены по принципу комбинирования функциональных модулей. Изучение механизмов их активности позволит использовать этот принцип для конструирования новых биологически активных молекул.

### **Апробация работы**

Основные материалы диссертации были представлены на XXIII, XXIV и XXVI Зимних молодежных научных школах «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2011, 2012 и 2014, соответственно), Гордоновской научной конференции «Антимикробные пептиды» (Лукка, Италия, 2011), V и VI Российских симпозиумах «Белки и пептиды» (Петрозаводск, 2011 и Уфа, 2013, соответственно), 37 и 38 конгрессах Федерации Европейских биохимических обществ (Севилья, Испания, 2012 и Санкт-Петербург, 2013, соответственно) и V Международной школе молодых ученых по молекулярной генетике «Непостоянство генома» (Звенигород, 2012).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано три статьи в международных научных журналах.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа изложена на 116 страницах, содержит 19 рисунков и 15 таблиц, имеет традиционную структуру и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов и списка использованной литературы, включающего 238 источников.

## Содержание работы

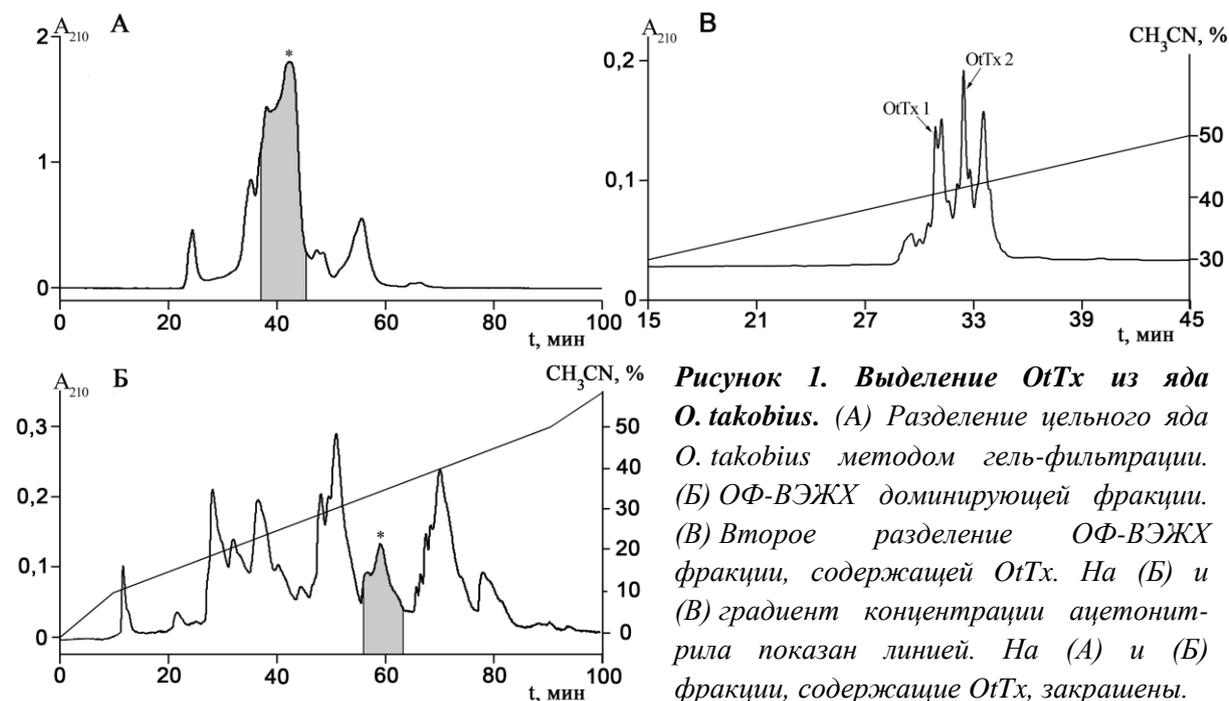
### Объекты и стратегия исследований

Объектами исследований являлись двудоменные токсины, которые выделяли из яда пауков *Oxyopes takobius* (семейство Oxyopidae) и *Cheiracanthium punctorium* (семейство Miturgidae) хроматографическими методами, а также двудоменные токсины паука *Lachesana tarabaevi* (семейство Zodariidae), охарактеризованные ранее. Биологическую активность изучали как на токсинах из природных источников, так и с использованием синтетических полипептидов. Структуры генов двудоменных токсинов исследовали путем амплификации фрагментов геномной ДНК пауков *Oxyopes lineatus* и *C. punctorium*. Молекулярную эволюцию двудоменных токсинов анализировали, используя полученные ранее библиотеки кДНК из ядовитых желез пауков *O. takobius* и *C. punctorium*, последовательности кДНК токсинов из открытых банков данных и набор компьютерных программ для биоинформатических исследований.

### Результаты

#### Выделение токсинов нового класса – двудоменных токсинов спайдеринов

Выделение токсинов с антимикробными и инсектицидными свойствами из цельного яда *O. takobius* проводилось по двустадийной схеме – сначала яд подвергали гель-фильтрации, а затем обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ). В результате были обнаружены полипептиды OtTx 1 (12030 Да) и OtTx 2 (12415 Да), получившие название спайдерины (рис. 1).



С помощью N-концевой деградации по Эдману была определена частичная аминокислотная последовательность выделенных токсинов: KFKWGLFSTAKKLYKKGKKLS KNKNFKKALKFGK (OtTx 1) и KFKLPKINWGKLASKAKDVYKKGQKLAKNKNVKKALK (OtTx 2). Сравнивая частичные последовательности с библиотекой кДНК из ядовитых желез паука *O. takobius*, транслированной *in silico*, были установлены полные последовательности токсинов OtTx 1 и OtTx 2 и их белков-предшественников, а также их близких гомологов (рис. 2) (номера в GenBank JX134894 – JX134897). Изоформы токсинов, обнаруженные в яде, были обозначены как OtTx 1a и OtTx 2a, а гомологичные им последовательности как OtTx 1b и OtTx 2b. Во всех обнаруженных токсинах содержится по 10 остатков цистеина, участвующих в образовании 5 внутримолекулярных дисульфидных связей.

Последовательности OtTx 1 (108 аминокислотных остатков, а. о.) и OtTx 2 (113 а. о.) совпадают на ~80% (рис. 2). Каждая из молекул состоит из двух частей (модулей) или доменов. N-Концевая часть не содержит остатков цистеина, в то время как С-концевой домен является цистеин-богатым. Короткая линкерная последовательность, соединяющая два модуля (EENEP у OtTx 1 и EVNER у OtTx 2) напоминает мотив процессинга PQM (в предшественниках OtTx PQM = EEAR), содержащий мутацию – замену аргинина на пролин.



**Рисунок 2. Сравнение последовательностей белков-предшественников токсинов OtTx. Отрицательно заряженные остатки выделены курсивом, положительно заряженные – жирным шрифтом, остатки цистеина в зрелой цепи показаны на темно-сером фоне, идентичные остатки – на светло-сером. Области, соответствующие сигнальному пептиду, пропептиду и фрагментам зрелого токсина, отмечены стрелками над последовательностями. Сайт процессинга пропептида показан жирной стрелкой, мотив PQM – звездочками. Дисульфидные связи, участвующие в образовании канонического мотива ICK, обозначены горизонтальными скобками над последовательностями, дополнительные дисульфиды – скобками под последовательностями.**

Последовательность С-концевого домена проявляет значительное сходство с окситоксинами ОхуТх 1 и ОхуТх 2, антагонистами потенциал-зависимых кальциевых кана-

лов из яда *Oxyopes* (см. сравнение последовательностей на рис. 3.). Окситоксины и С-концевой домен OtTx характеризуются общим мотивом расположения остатков цистеина ( $C^1X_6C^2X_3C^3XC^4C^5X_4C^6XC^7X_mC^8XC^9X_nC^{10}$ ), поэтому их пространственные структуры тоже, скорее всего, сходны. В дополнение к трем дисульфидам  $C^1 - C^5$ ,  $C^2 - C^6$ ,  $C^4 - C^9$ , формирующим мотив ИСК, они содержат две дополнительные S-S связи  $C^3 - C^{10}$  и  $C^7 - C^8$ .

В открытых базах данных не было обнаружено последовательностей, гомологичных линейному домену OtTx. Он положительно заряжен (заряд +16 и +13 при pH 7 для OtTx 1 и OtTx 2, соответственно; pI ~11) и, согласно расчетам, проявляет склонность к формированию  $\alpha$ -спирали. Положительно заряженные и гидрофобные остатки расположены таким образом, что при спирализации полипептидной цепи они образуют кластеры. Такие свойства характерны для мембрано-активных и антимикробных пептидов из ядов различных пауков, в том числе *O. takobius*. Таким образом, OtTx образуют новый класс токсинов пауков, спайдеринов, объединяющих N-концевой линейный и С-концевой ИСК домены.

OtTx 1a-N	<b>KFKW</b> GLF <b>ESTAKKLYKKGK</b> LS <b>KNKN</b> = <b>FKKAL</b> K <b>FGKQLAK</b> N <b>LQAG</b>	100 %
CIT 1a-N	---GFFGN <b>TWKKIKGKADK</b> IML--- <b>KKAVKIMV</b> <b>KKEGISK</b> ---	29 %
Oxyopin 2a	--- <b>GK</b> - <b>PSVFGKILRSIAK</b> <b>VFKGVGKVRKQF</b> <b>KTASDID</b> <b>KNQ</b> ---	32 %

OtTx 1a-C	GTPVGN <b>NCWAIGT</b> T <b>CSDDC</b> D <b>CEPHHCH</b> C <b>PAG</b> ----- <b>KWLFGLFR</b> C <b>TCOVT</b> = <b>ESDKV</b> <b>NCPPAE</b> -	100 %
Oxytoxin-2	--- <b>AWKCLPKD</b> ST <b>CGDDC</b> D <b>CEGLHCH</b> C <b>PLR</b> ----- <b>NMLPAILRC</b> S <b>CS</b> - <b>KDDHINT</b> C <b>PKYKS</b>	45 %
Oxytoxin-1	--- <b>DWECLPLHSS</b> C <b>DND</b> C <b>VCCKNH</b> H <b>CH</b> C <b>BYSNVSKLE</b> <b>KWLP</b> E <b>WAKI</b> P <b>DAL</b> <b>KRC</b> S <b>CORNDK</b> D <b>GKINT</b> C <b>DKYKN</b>	39 %

**Рисунок 3. Сравнение последовательностей OtTx 1a с другими пептидами из яда пауков.** Вверху N-концевой модуль OtTx 1a (OtTx 1a-N) показан в сравнении с N-концевым фрагментом цитотоксина 1a (CIT 1a-N) и оксиопином 2a. Внизу: С-концевой модуль токсина (OtTx 1a-C) в сравнении с окситоксинами 1 и 2. Положительно заряженные остатки выделены жирным шрифтом. Идентичные а. о. отмечены светло-серым фоном, консервативные остатки цистеина – темно-серым. Доля остатков, сходных с OtTx 1a, показана справа (здесь и далее использовалась программа Vector NTI).

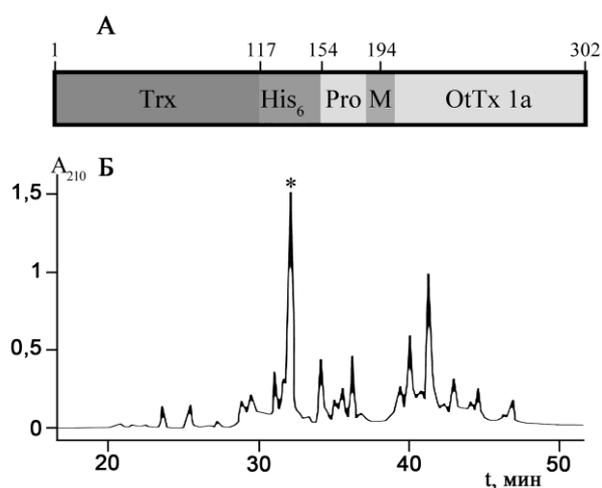
Как и другие токсины пауков, OtTx синтезируются в составе белков-предшественников, состоящих из трех фрагментов: N-концевого сигнального (пре-) пептида, пропептида и зрелого пептида. Про-последовательность имеет кислый характер (при pH 7 ее заряд равен -14, pI ~3). Вероятно, взаимодействуя с положительно заряженным N-концевым линейным доменом зрелой цепи, она ингибирует его цитолитическую активность.

### Получение полноразмерного OtTx 1a и его фрагментов

Мы разработали систему получения рекомбинантного токсина OtTx 1a в культуре *Escherichia coli* (штаммы BL, Origami B). Токсин синтезировался в виде химеры с белком-помощником тиоредоксином (Txh-OtTx 1a). В состав гибридного белка были введены природный пропептид из белкового предшественника OtTx 1a, последовательность из 6 остатков гистидина для очистки гибридного белка аффинной хроматографией и остаток

метионина для специфического расщепления BrCN (рис. 4, А). После расщепления гибридного белка целевой полипептид выделяли с помощью ОФ-ВЭЖХ (рис. 4, Б), выход составил 0,5 мг/л культуры. Совпадение молекулярных масс, хроматографической подвижности и инсектицидной активности рекомбинантного и нативного токсинов свидетельствует в пользу их идентичности.

Для изучения функциональной роли каждого из модулей OtTx 1a мы получили его производные OtTx 1a-AMP и OtTx 1a-ICK, соответствующие его отдельным доменам. Пептид OtTx 1a-AMP соответствует N-концевому домену OtTx 1a (а. о. 1 – 41). OtTx 1a-AMP был получен методом твердофазного химического синтеза в лаборатории протеомики ИБХ РАН.

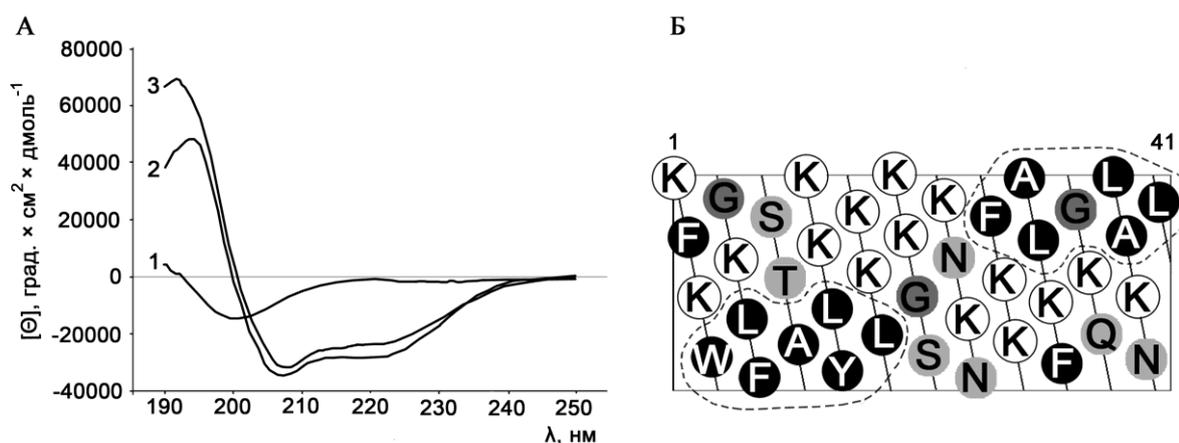


**Рисунок 4. Структура гибридного белка Trx-OtTx 1a (А) и очистка методом ОФ-ВЭЖХ рекомбинантного токсина OtTx 1a после расщепления Trx-OtTx 1a BrCN (Б). Функциональные элементы Trx-OtTx 1a показаны схематично прямоугольниками. Trx – домен тиоредоксина; His<sub>6</sub> – олигогистидиновая последовательность; М – остаток метионина, введенный непосредственно перед зрелым полипептидом OtTx 1a. Числа над схемой соответствуют номерам а. о. химерного белка. (Б) Фракция, содержащая OtTx 1a, отмечена звездочкой.**

Полипептид OtTx 1a-ICK соответствует С-концевому домену OtTx 1a (а. о. 50 – 108). Способ получения OtTx 1a-ICK аналогичен примененному ранее для OtTx 1a, за исключением того, что в состав гибридного белка Trx-OtTx 1a-ICK не вводилась последовательность пропептида. Только в штамме *E. coli* Origami В был высокий выход рекомбинантного полипептида, однако правильного образования дисульфидов не происходило, и наблюдалось несколько конформаций. Для получения OtTx 1a-ICK в нативной конформации гибридный белок подвергали процедуре рефолдинга, во время которой тиольные группы окислялись кислородом воздуха. Затем Trx-OtTx 1a-ICK расщепляли BrCN и анализировали методом ОФ-ВЭЖХ. О получении единственной конформации полипептида и однозначного замыкания дисульфидных мостиков судили по форме хроматографического профиля. Молекулярная масса полученного таким образом OtTx 1a-ICK точно соответствовала расчетной массе. Выход продукта составил 5 мг/л культуры, что значительно превышает выход полноразмерного рекомбинантного токсина.

## Вторичная структура OtTx 1a

Алгоритмы предсказания вторичной структуры и спектры кругового дихроизма, полученные для полноразмерного токсина и его производных, показывают, что OtTx 1a состоит из двух доменов. N-Концевой фрагмент в окружении, имитирующем мембранное, склонен формировать  $\alpha$ -спираль (рис. 5). Для С-концевого фрагмента характерна высокая склонность к формированию  $\beta$ -тяжей и  $\beta$ -изгибов, что согласуется с предположением о том, что для него характерен ноттиновый фолд. В окружении, имитирующем мембранное (50% трифторэтанол (ТФЭ), 20 мМ додецилсульфат натрия (ДСН)), вторичная структура OtTx 1a-ИСК меняется крайне незначительно.



**Рисунок 5. (А) Спектры кругового дихроизма и (Б) проекция спиральной сети пептида OtTx 1a-AMP. (А) Кривая 1 – спектр пептида в 50 мМ фосфатном буфере (рН 7,2), кривая 2 – спектр пептида в 50% ТФЭ, кривая 3 – в 20 мМ ДСН. (Б) Положительно заряженные остатки обозначены белыми кругами, гидрофобные остатки – черными, остатки глицина – темно-серыми, гидрофильные незаряженные остатки – светло-серыми. Гидрофобные кластеры обведены пунктирными линиями.**

## Биологическая активность OtTx 1a и его производных

Токсин OtTx 1a проявляет инсектицидную и цитолитическую активности. В тестах на личинках мясной мухи *Sarcophaga carnaria* полулетальная доза ( $LD_{50}$ ) составила 75 мкг/г (6,3 нмоль/г), а значения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) роста бактериальных культур находятся в диапазоне 1 – 10 мкМ (табл. 1). Для того чтобы выяснить, какая часть токсина является функционально важной, мы протестировали активность OtTx 1a-AMP и OtTx 1a-ИСК.

OtTx 1a-AMP обладает тем же действием, что и полноразмерный токсин:  $LD_{50}$  на личинках мясной мухи составила 50 мкг/г (11 нмоль/г), а значения МИК для разных видов бактерий были в том же диапазоне концентраций. OtTx 1a-AMP не только ингибирует бактериальный рост, но и обладает бактерицидной активностью. Для *Staphylococcus aureus* и *Enterococcus faecalis* значения минимальной бактерицидной концентрации и МИК совпадают (табл. 1). Бактерицидное действие OtTx 1a-AMP связано с образованием

дефектов в цитоплазматической мембране. Этот пептид способен индуцировать лизис эритроцитов (при концентрации ~8 мкМ наблюдается 50%-ный выход гемоглобина) и вызывать гибель клеток A549 и HeLa (50%-ная гибель наблюдается при концентрациях ~20 мкМ и ~15 мкМ, соответственно). Способность пептида OtTx 1a-AMP взаимодействовать с клеточными мембранами подтвердилась с помощью метода соосаждения с липосомами. OtTx 1a-AMP связывается с липосомами, имитирующими как бактериальные, так и эукариотические мембраны. OtTx 1a-ICK, в отличие от полноразмерного токсина и его линейного фрагмента, не показал инсектицидной и антибактериальной активности.

Бактериальный штамм	Пептиды		
	OtTx 1a	OtTx 1a-AMP	OtTx 1a-ICK
	МИК, мкМ		
<i>Arthrobacter globiformis</i> ВКМ Ac-1112	0,6 – 1,25	0,6 – 1,25	>25
<i>Bacillus subtilis</i> ВКМ В-501	0,12 – 0,25	0,12 – 0,25	>25
<i>E. faecalis</i> ВКМ В-871	–	5 – 10	–
<i>E. coli</i> DH5	0,12 – 0,25	0,12 – 0,25	>25
<i>Pseudomonas. aeruginosa</i> PAO1	6 – 12	0,37 – 0,75	>25
<i>S. aureus</i> 209P	–	0,6 – 1,25	–

Таблица 1. Антимикробная активность OtTx 1a и его модулей.

### Анализ кДНК двудоменных токсинов *Oxyuripes*

Всего в библиотеке кДНК из ядовитых желез *O. takobius* было обнаружено 15 последовательностей, кодирующих спайдерины. С помощью амплификации кДНК из ядовитых желез были установлены 6 последовательностей, кодирующих спайдерины *O. lineatus* (OtTx, рис. 6) (номера в GenBank KF766543 – KF766559, KF766561).

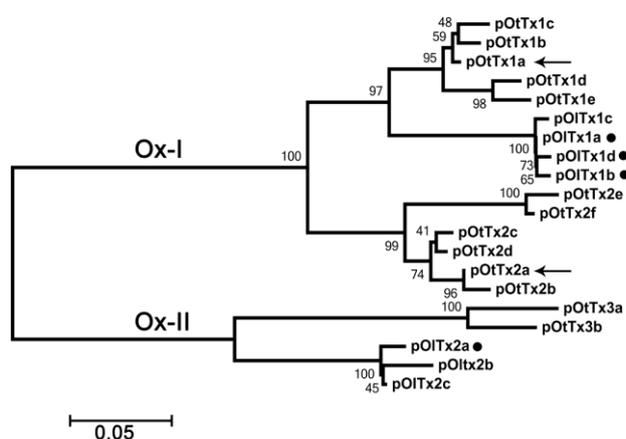


Рисунок 6. Филогенетическое дерево, построенное на основе сравнения последовательностей предшественников спайдеринов. Масштабная линейка соответствует количеству нуклеотидных замен на один сайт вдоль ветви. Уровни поддержки указаны рядом с соответствующими ветвями. Стрелками указаны предшественники токсинов, выделенных из яда *O. takobius*, жирными точками – те, для которых также была установлена последовательность соответствующих фрагментов геномной ДНК.

Последовательности кДНК были транслированы *in silico*, были определены последовательности сигнальных пептидов и пропептидов (рис. 7). В общей сложности были обнаружены 19 новых последовательностей токсинов, относящихся к семейству спайде-

ринов. Сигнальные пептиды и пропептиды идентичны друг другу, либо проявляют высокий уровень сходства, в то время как зрелые фрагменты более вариабельны. Зрелые пептиды можно объединить в два подсемейства, различающиеся по длине: Ох-I (109 – 114 а. о.) и Ох-II (135 – 142 а. о.). К подсемейству Ох-I были отнесены 14 последовательностей: ОтТх 1а – 1е, ОтТх 2а – 2ф, и ОИТх 1а – 1с. ОтТх 3а и 3б и ОИТх 2а – 2с были помещены в подсемейство Ох-II. Разница в длинах между семействами Ох-I и Ох-II обусловлена разницей в длинах N-концевых доменов зрелых полипептидов (рис. 8). Ноттиновые домены более консервативны (как минимум 59% идентичных а. о.), а у некоторых токсинов они даже идентичны (как на уровне белка, так и на уровне кДНК).

### Структура генов спайдеринов

С помощью амплификации и секвенирования фрагментов геномной ДНК были определены последовательности генов, кодирующих токсины ОИТх 1а, ОИТх 1б и ОИТх 2а (рис. 7). Последовательность, кодирующая ОИТх 1д (номер в GenBank KF766560) была найдена только на уровне геномной ДНК, но не кДНК. Как и большинство генов однодоменных токсинов, гены двудоменных токсинов *O. lineatus* оказались безинтронными.

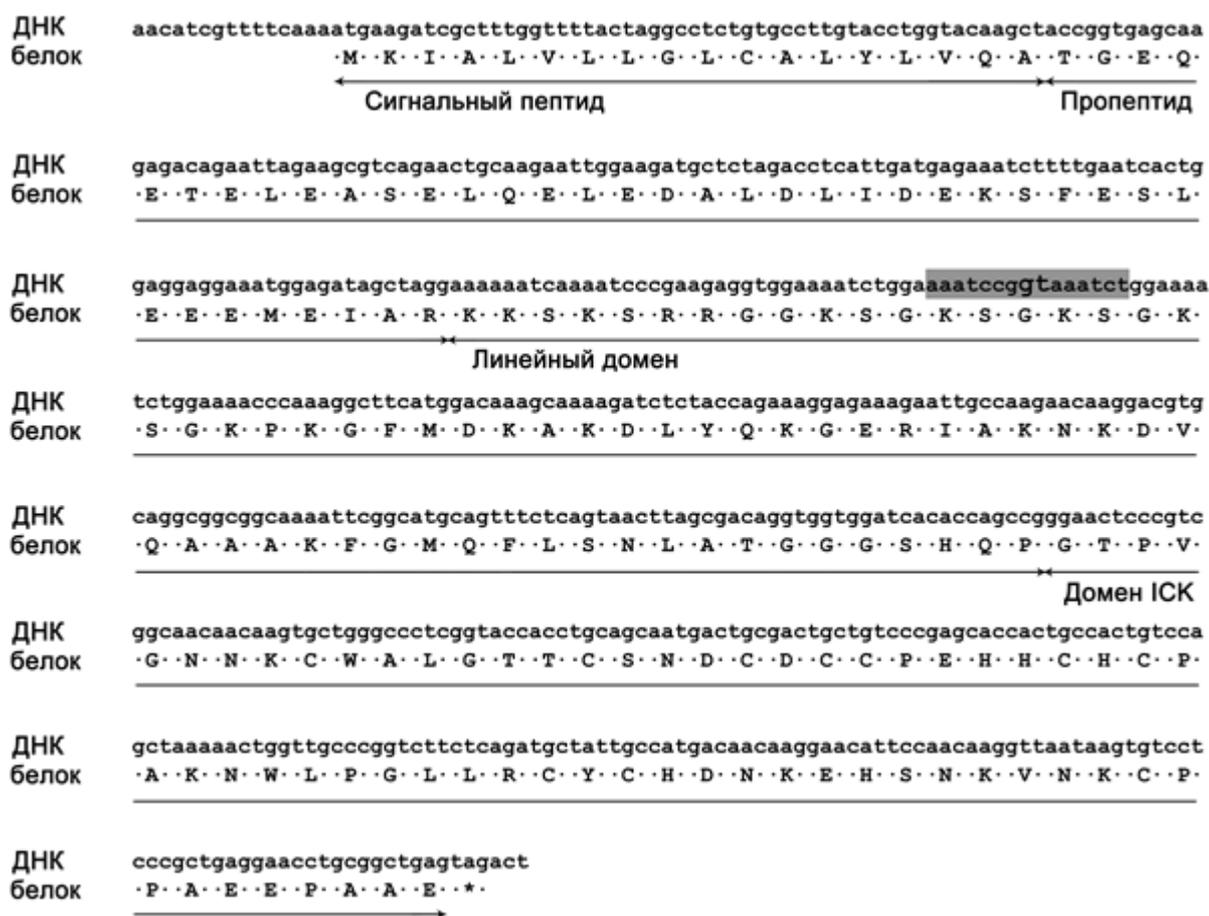
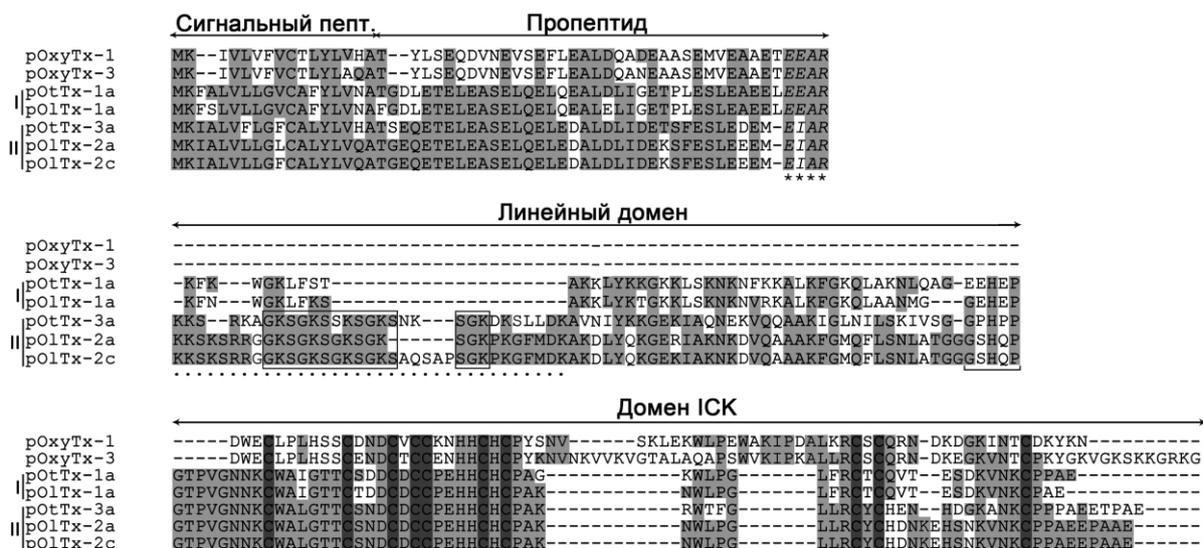


Рисунок 7. Ген, кодирующий ОИТх 2а. Сигнальный пептид, пропептид, линейный и ИСК домены обозначены стрелками. Возможный донорный сайт сплайсинга выделен темно-серым цветом.



**Рисунок 8.** Сравнение белков-предшественников однодоменных ноттиновых токсинов (*OxyTx 1* и *OxyTx 3*) и спайдеринов, принадлежащих к подсемействам *Ox-I* (*OtTx 1a* и *OITx 1a*) и *Ox-II* (*OtTx 3a*, *OITx 2a* и *OITx 2c*). Идентичные остатки выделены светло-серым цветом, консервативные остатки цистеина зрелой цепи – темно-серым. Сайты процессинга PQM отмечены курсивом и звездочками, линкерная последовательность между доменами – горизонтальной скобой. «Дополнительная» последовательность обозначена точками, «базовая» последовательность – фрагмент между «дополнительной» и линкерной последовательностями. Повторы Gly-Lys-Ser помещены в прямоугольники.

### Анализ молекулярной эволюции двудоменных токсинов *Oxyopes*

Методом Нея-Годжбори с помощью программы MEGA 5 был проведен анализ скорости эволюции фрагментов генов, кодирующих сигнальные пептиды, пропептиды, а также линейные и ноттиновые домены спайдеринов (всего 20 последовательностей). Действие мощного отрицательного отбора было зафиксировано не только для сигнальных пептидов и пропептидов, но и для зрелых доменов (табл. 2). Парное сравнение последовательностей выявило положительный отбор, действующий в парах *OtTx 2a* – *OtTx 2e* и *OtTx 2b* – *OtTx 2e* между их N-концевыми доменами. Последний вывод, однако, не проходит поправку Бонферрони для множественных сравнений, поэтому нельзя исключить, что этот результат является ложноположительным. Дальнейшее парное сравнение мы проводили методом максимального правдоподобия в программе CODEML из пакета программ PAML, и он подтвердил наши наблюдения. Подавляющее большинство пар N-концевых доменов подвергается отрицательному отбору:  $\omega \leq 0,3$  для 45,2% пар, и  $0,3 < \omega < 0,9$  для 48,4% пар, где  $\omega = d_N/d_S$ . Однако для пар *OtTx 2a* – *OtTx 2e* и *OtTx 2b* – *OtTx 2e* значение  $\omega$  достигало 15,3, и оно было больше 2 для четырех других пар, что можно интерпретировать как признак положительного отбора. Аналогичный анализ, проведенный для C-концевых доменов и препро-последовательностей, показал тенденцию к отрицательному отбору без каких-либо указаний на положительный отбор. Таким обра-

зом, гены, кодирующие двудоменные токсины *Oxуores*, консервативны, однако положительный отбор может действовать на N-концевой домен. Это было проверено и подтверждено тестами отношения правдоподобия (LRT, от англ. likelihood ratio test) (табл. 3). Оба теста показали, что последовательности, кодирующие зрелые пептиды, подвержены положительному отбору, хотя M7/M8 LRT был менее значим, чем M1a/M2a LRT. Модели M2a и M8, допускающие положительный отбор, показали, что только сайт Leu-14 (нумерация по последовательности OITx 1a) подвержен положительному отбору ( $P > 95\%$ ), этот сайт относится к N-концевому домену.

Фрагменты белка-предшественника	p	$d_S - d_N$	Количество сайтов, использованных в анализе
Сигнальный пептид	0,039	1,783	18
Пропептид	0,017	2,149	39
Линейный домен	0,0001	3,951	46
Ноттиновый домен	0,001	3,216	58

**Таблица 2. Результаты Z-теста на отрицательный отбор для сигнальных пептидов, пропептидов, линейных и ноттиновых доменов спайдеринов.**  $d_S$  и  $d_N$  – количество синонимичных и несинонимичных нуклеотидных замен на сайт, соответственно.  $p$  – вероятность того, что нулевая гипотеза о нейтральности ( $d_N = d_S$ ) будет отвергнута в пользу альтернативной гипотезы ( $d_N < d_S$ ). Значения  $p < 0,05$  считали значимыми.

Модель	$\ln L$	$2\Delta l$	Уровень значимости	Сайты под действием положительного отбора
M1a	-1627,942613	6,361392	$p < 0,05$	14 L
M2a	-1624,761917			
M7	-1624,685734	4,749764	$p < 0,1$	14 L
M8	-1622,310852			

**Таблица 3. Результаты тестов отношения правдоподобия (LRT) для двудоменных токсинов *Oxуores*.**  $2\Delta l = 2 \times (\ln L - \ln L_0)$ , где  $L_0$  – модель, не допускающая положительного отбора (M1a и M7). Значения  $2\Delta l$  сравнивали с таблицей значений  $\chi^2$  для двух степеней свободы.  $p$  – уровень значимости.

Структура двудоменных спайдеринов выглядит мозаичной, поэтому мы провели поиск генов, гомологичных их возможным предкам. Мы не обнаружили значимого сходства между N-концевым линейным доменом спайдеринов и каким-либо другим известным белком. С-Концевой домен ИСК, однако, проявляет значимое сходство с окситоксинами (~45% идентичных а. о.). В библиотеке кДНК из ядовитых желез *O. takobius* был проведен поиск последовательностей, гомологичных спайдеринам. Для этого мы извлекли из библиотеки последовательности, кодирующие предшественники токсинов (в том числе OхуТх 1, зарегистрирован в GenBank под номером KF766562). Сравнение извлеченных белков и последовательностей N-концевого домена спайдеринов с помощью программы BLASTP не показало значимого сходства между ними. Однако последовательности пре-

пропептидов и С-концевых доменов двудоменных токсинов демонстрировали значимый уровень сходства с соответствующими последовательностями однодоменных ноттиновых токсинов (около 40% сходства, рис. 8).

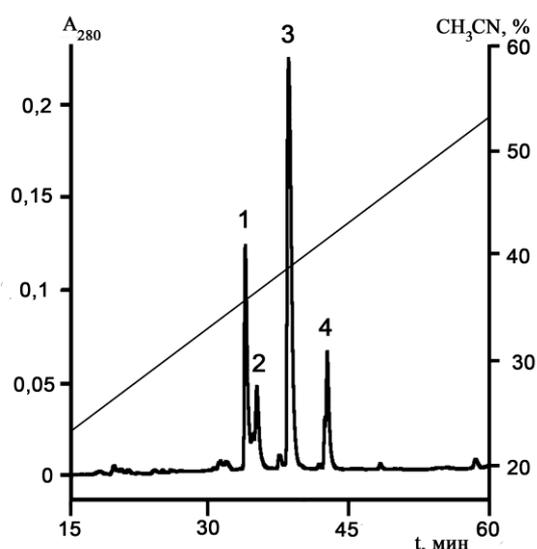
### Выделение новых двудоменных токсинов из яда паука *C. punctoriium*

В яде паука *C. punctoriium* ранее тоже были обнаружены двудоменные токсины, которые, однако, относятся к другому структурному классу – они состоят из двух ноттиновых доменов (Vassilevski *et al.* 2010). Были найдены новые представители этого класса, получившие название СрТх-подобных токсинов.

Цельный яд *C. punctoriium* фракционировали с помощью двустадийной хроматографии (гель-фильтрация и ОФ-ВЭЖХ). В результате профиль ОФ-ВЭЖХ содержал 4 пика (рис. 9). Ранее уже было опубликовано, что пик 3 соответствует токсину СрТх 1. Полипептиды из пиков 1, 2 и 4 были названы СрТх 2а, СрТх 3а и СрТх 4а, соответственно. Сначала мы установили частичные N-концевые аминокислотные последовательности новых токсинов методом деградации по Эдману, а затем путем их сопоставления с последовательностями транслированных кДНК были получены полные последовательности (табл. 4). Токсины СрТх 2а, СрТх 3а и СрТх 4а обладают инсектицидной активностью.

№ пика	Молекулярная масса	N-Концевая последовательность	Название токсина
1	14970	GKKCIERNKECTNDRHGCCR	СрТх 2а
2	14980	TCVPRDGDCTENRKACCRSK	СрТх 3а
3	15100	GKTCIERNKECTNDRHGCCR	СрТх 1а – 1с
4	15080	ASCTERKHDCTKDRHSCCRG	СрТх 4а

Таблица 4. Токсины, идентифицированные в яде *C. punctoriium*. Номера пиков соответствуют нумерации на хроматограмме на рис. 9.



Токсин	ЛД <sub>50</sub> , нмоль/г	ПД <sub>50</sub> , нмоль/г
СрТх 2	>3,3	2,2 – 3,3
СрТх 3	2,2 – 3,3	1,7 – 2,2
СрТх 4	2,2 – 3,3	1,7 – 2,2

Таблица 5 (вверху). Результаты теста на инсектотоксичность СрТх на личинках мясной мухи *S. carnaria*. ЛД<sub>50</sub> – 50% летальная доза, ПД<sub>50</sub> – 50% паралитическая доза.

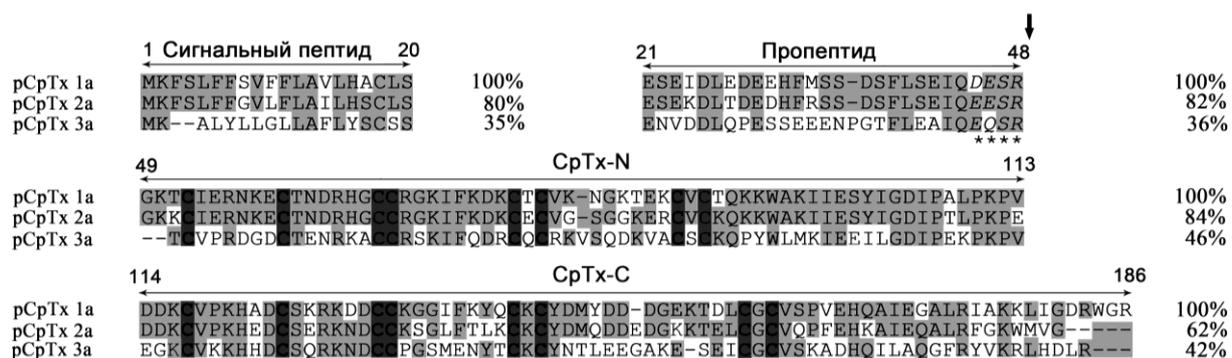
Рисунок 9 (слева). Разделение методом ОФ-ВЭЖХ фракции из яда *C. punctoriium*, содержащей компоненты с массой 15 кДа. 1 – СрТх 2а, 2 – СрТх 3а, 3 – СрТх 1а-с и 4 – СрТх 4а.

## Последовательности кДНК, кодирующие двудоменные токсины

### *C. punctorium*

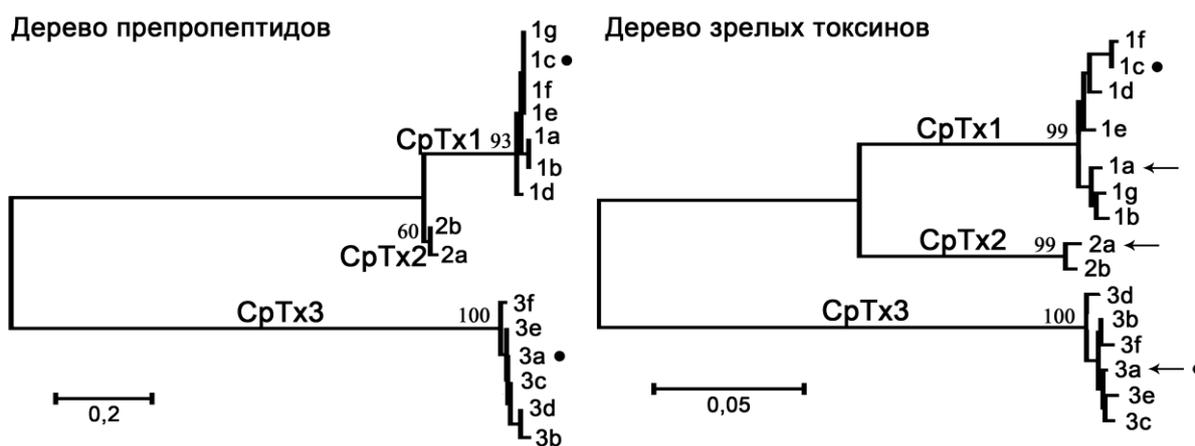
Ранее уже сообщалось о трех последовательностях кДНК, кодирующих токсины CrTx 1a, CrTx 1b и CrTx 1c. Мы нашли 12 новых последовательностей, проявляющих сходство с CrTx 1 – 3, обнаруженными в яде (номера в GenBank KF155268 – KF155271 и KF155273 – KF155280).

Для дальнейшего анализа полученные последовательности кДНК обрабатывались *in silico*. На рис. 10 показана организация белков-предшественников CrTx 1a, CrTx 2a и CrTx 3a (pCrTx 1a, pCrTx 2a и pCrTx 3a). Токсин CrTx 2a (расчетная молекулярная масса 14971 Да) амидирован на С-конце (так же, как CrTx 1a – 1c). У CrTx 3a отсутствует С-концевой остаток аргинина белка-предшественника (номера в UniProt C0HJD4 и C0HJD5).



**Рисунок 10.** Сравнение последовательностей белков-предшественников токсинов CrTx 1a, CrTx 2a и CrTx 3a. Идентичные остатки выделены серым фоном, остатки цистеина – темно-серым, сайты P/Q/M – курсивом и звездочками. Стрелкой отмечен сайт процессинга. Доли идентичных остатков относительно pCrTx 1a показаны отдельно для сигнальных пептидов, пропептидов и зрелых цепей.

Методом ближайшего соседа были построены филогенетические деревья для фрагментов кДНК, кодирующих препро-последовательности и зрелые цепи (рис. 11). Дерево «зрелых токсинов» состоит из трех ветвей, каждая из которых несет листья, соответствующие идентифицированным в яде соединениям (CrTx 1a – 1c, CrTx 2a, и CrTx 3a). Разница между последовательностями на каждой из ветвей заключается в нескольких точечных нуклеотидных заменах. Топология «препропептидного» дерева и дерева «зрелых токсинов» в значительной мере совпадает. Таким образом, на уровне последовательностей кДНК мы обнаружили три группы двудоменных токсинов *C. punctorium*: CrTx 1, CrTx 2 и CrTx 3. Новые токсины получили названия CrTx 1d – 1g, CrTx 2a, 2b и CrTx 3a – 3f.



**Рисунок 11.** Филогенетические деревья, построенные методом ближайшего соседа на основе сравнения фрагментов  $\kappa$ ДНК, кодирующих препро-последовательности и зрелые токсины СрТх. Масштабные линейки соответствуют количеству нуклеотидных замен на сайт вдоль каждой ветви. Уровни поддержки для групп СрТх 1, СрТх 2 и СрТх 3 указаны над соответствующими ветвями. Стрелками указаны последовательности, кодирующие токсины, выделенные из яда *C. punctatorum*, жирными точками – те, для которых также была установлена последовательность соответствующих фрагментов геномной ДНК.

### Молекулярная эволюция двудоменных токсинов *C. punctatorum*

Методом Нея-Годжбори была проанализирована скорость эволюции на различных участках генов, кодирующих фрагменты белков-предшественников (табл. 6).

Группа токсинов	Сигнальный пептид			Пропептид			Зрелая цепь		
	p	$d_S-d_N$	Количество сайтов***	p	$d_S-d_N$	Количество сайтов***	p	$d_S-d_N$	Количество сайтов***
СрТх 1	Идентичные*			Идентичные*			0,003	2,86	135
СрТх 2	Идентичные*			Идентичные*			0,039	1,78	132
СрТх 3**	Идентичные*			Идентичные*			0,073	1,46	132
СрТх 1а – СрТх 2а	0,161	0,99	18	0,030	1,89	27	0,000	5,96	128
СрТх 1а – СрТх 3а	0,008	2,47		0,001	2,39		0,000	3,44	
СрТх 2а – СрТх 3а	0,012	2,28		0,009	2,36		0,002	3,03	

**Таблица 6.** Результаты Z-теста на отрицательный отбор для фрагментов генов, кодирующих сигнальные пептиды, пропептиды и зрелые цепи белков-предшественников СрТх.  $d_S$  и  $d_N$  – количество синонимичных и несинонимичных нуклеотидных замен на сайт, соответственно. p – вероятность того, что нулевая гипотеза о нейтральности ( $d_N = d_S$ ) будет отвергнута в пользу альтернативной гипотезы ( $d_N < d_S$ ). Значения  $p < 0,05$  считали значимыми. \*Идентичные либо содержащие одну нуклеотидную замену последовательности. \*\*В некоторых парах был зафиксирован положительный отбор ( $p < 0,05$ ,  $d_N - d_S \sim 2$ ). \*\*\* Количество сайтов, использованных в анализе.

Отрицательный отбор действует как на препропептиды, так и на зрелые цепи. Внутри группы СрТх 3 в некоторых парах последовательностей (СрТх 3а – СрТх 3ф, СрТх 3с – СрТх 3ф) наблюдается положительный отбор ( $p < 0,05$ , однако не проходит поправку Бонферрони на множественное сравнение). Дальнейший филогенетический анализ

методом максимального правдоподобия также подтвердил наши наблюдения. Для зрелых последовательностей результаты обоих тестов LRT не были значимыми, поэтому нельзя предположить, что на них действует положительный отбор. Таким образом, ускоренная эволюция не свойственна двудоменным токсинам *C. punctorium*, и отрицательный отбор действует на всех отрезках предшественников токсинов.

Структура двудоменных СрТх-подобных токсинов выглядит мозаичной. N-Концевые домены (СрТх-N) и С-концевые домены (СрТх-С) этих токсинов проявляют лишь умеренное сходство (16 – 23%). Скорее всего, появление СрТх-подобных токсинов связано с эволюционным слиянием отдаленно родственных ноттиновых пептидов. Среди известных последовательностей наибольшее сходство с фрагментами, кодирующими отдельные домены СрТх, проявляют кДНК LSTX из ядовитых желез паука *Lycosa singorietis* (рис. 12). В ходе эволюции в геноме *C. punctorium* могла иметь место «миграция» последовательности, кодирующей зрелый пептид гипотетического гомолога LSTXA1, в ген, кодирующий гипотетический гомолог LSTXC1.

СрТх 2a-prepro	MKFSLFFGVLFLLAILHSCLSSESEKDLTDEDFHRSSDSFLSEI-QEESR	100%
LSTXC1-prepro	MKVLVLFVSLFLTLFYSSTEA----IDFSDAEDDMLSLMANEQVR	31%
	****	
СрТх 2a-N	GKKCIERNKETNDRHGECRGKIFKDKEEVVG-SGG--KRRVVKOKKWKIIESYIGDIPILPKPE	100%
LSTXC1-mat	AKAATPRLHDSHDRHSECRGELFKDVIYFYPEGEDKTEVVISQQPKSHKYLEKVVDKAKIVVG--	40%
СрТх 2a-C	DDKIVPKHEDTSERKNDCKSGLFTLKKKCYDMQDDEDGKKTTELGVQVFFEHKAIHQALRFGKWMVG	100%
LSTXA1-mat	-KEIIPKHNETSNKHGECRGNFEKYKQCTTVVT-QDGEQTERCFGTTPHHKAAELVVGEGKKIFG	40%

**Рисунок 12.** Сравнение фрагментов белка-предшественника рСрТх 2a с соответствующими фрагментами LSTXC1 и LSTXA1. Препропептиды обозначены как «-prepro», зрелые цепи – «-mat». Идентичные остатки показаны на сером фоне, остатки цистеина в зрелых цепях – на темно-сером, сайты PQM – курсивом и обозначены звездочками. Справа указана доля идентичных остатков относительно рСрТх 2a.

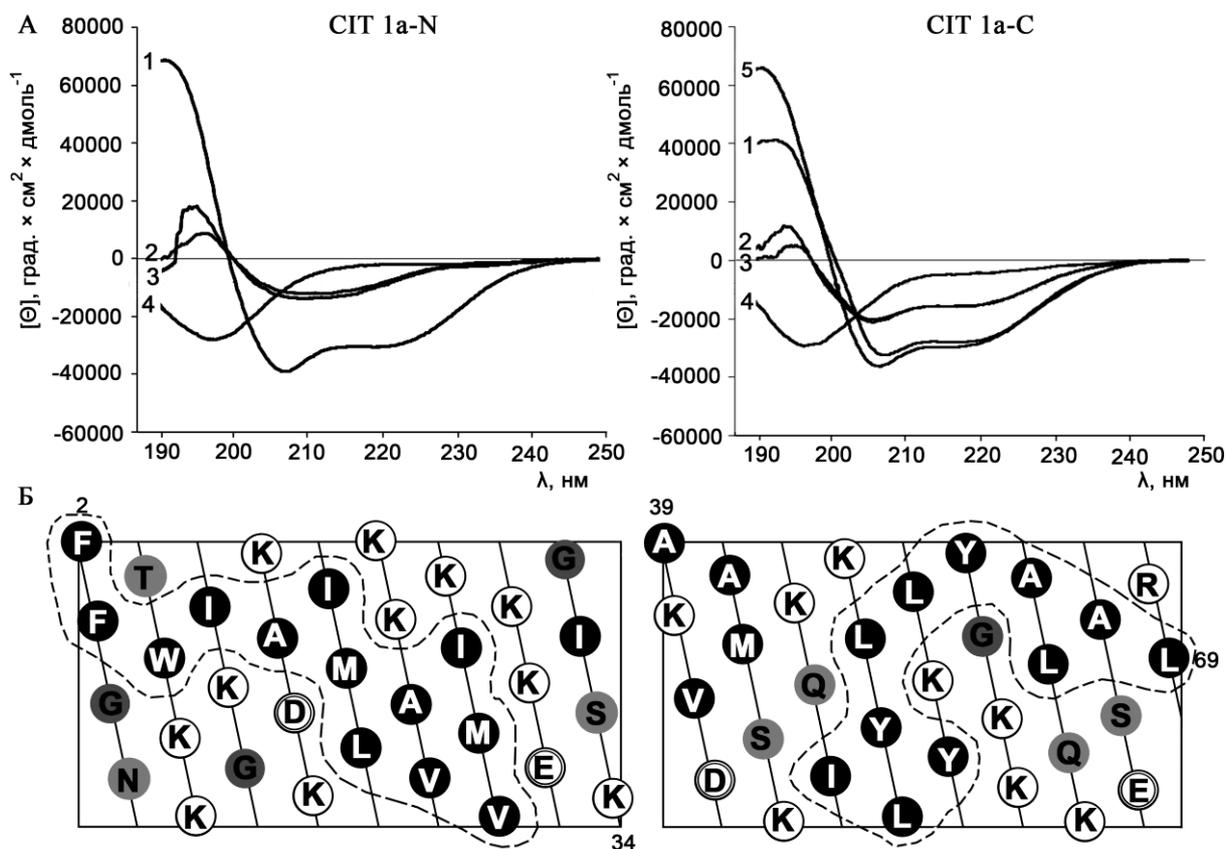
### Гены, кодирующие двудоменные токсины *C. punctorium*

С помощью специфических праймеров мы амплифицировали и секвенировали фрагменты геномной ДНК паука *C. punctorium*, кодирующие двудоменные токсины. Были идентифицированы гены белков-предшественников СрТх 1с, СрТх 3а и СрТх 3g (номера в GenBank KF255415 – KF255417). Гены двудоменных токсинов *C. punctorium* не содержат интронов.

### Изучение активности модулей двудоменных токсинов паука *L. tarabaevi*

Цитоинсектотоксины (СIT) *L. tarabaevi* составлены из двух модулей, каждый из которых склонен к формированию амфипатической α-спирали и соответствует «обычному» цитотоксину из яда пауков (Vassilevski *et al.* 2008). В лаборатории протеомики ИБХ РАН были получены производные CIT 1a, соответствующие N-концевому (CIT 1a-N, а. о. 1 – 34) и С-концевому (CIT 1a-C, а. о. 39 – 69) модулям. В окружении, имитирующем

мембранное (50% ТФЭ, суспензии 1,2-диолеил-глицеро-3-фосфохолиновых (ДОФХ) и 1,2-диолеил-глицеро-3-фосфоглицерол/1,2-диолеил-глицеро-3-фосфоэтаноламиновых (ДОФГ/ДОФЭ) липосом, 20% ДСН), фрагменты СІТ 1а приобретают  $\alpha$ -спиральную конформацию, а в воде преобладает неупорядоченная структура (рис. 13).



**Рисунок 13.** Вторичная структура пептидов СІТ 1а-N и СІТ 1а-С. (А) Спектры кругового дихроизма пептидов СІТ 1а-N и СІТ 1а-С в разных растворителях: 1 – 50% ТФЭ, 2 – суспензия ДОФГ/ДОФЭ липосом, 3 – суспензия ДОФХ липосом, 4 – вода, 5 – 20 мМ ДСН. (Б) Проекция спиральной сети СІТ 1а-N и СІТ 1а-С. Положительно заряженные остатки обозначены белыми кругами, гидрофобные остатки – черными, остатки глицина – темно-серыми, гидрофильные незаряженные остатки – светло-серыми, отрицательно заряженные остатки – белыми кругами с двойной линией по краю.

В тестах на антимикробную активность оказалось, что СІТ 1а-N значительно активнее, чем СІТ 1а-С, а полноразмерный пептид, в свою очередь, значительно активнее, чем каждый из его фрагментов или их эквимоллярная смесь (табл. 7).

Бактериальный штамм	Полипептид			
	СІТ 1а, по Vassilevski <i>et al.</i> 2008)	СІТ 1а-N	СІТ 1а-С	Эквимоллярная смесь
	МИК, мкМ			
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	0,6	5 – 10	40 – 80	2,5 – 5
<i>B. subtilis</i> ВКМ В-501	0,9	1,3 – 2,5	20 – 40	1,3 – 2,5

**Таблица 7.** Минимальные ингибирующие концентрации СІТ 1а и его производных СІТ 1а-N и СІТ 1а-С.

Таким образом, в действии модулей наблюдается синергизм. В тестах на инсектицидную активность на личинках мясной мухи *S. carnaria* вплоть до дозы ~55 нмоль/г СІТ 1а-Н и СІТ 1а-С оказались неактивны.

### **Обсуждение результатов**

#### **Получение рекомбинантных полипептидов**

Линейные катионные пептиды с мембранолитической активностью являются цитотоксичными и легко подвергаются расщеплению внутриклеточными протеазами. Правильное сворачивание дисульфид-богатых пептидов в цитоплазме бактериальных клеток затруднено, так как в ней поддерживается восстановительный потенциал. Токсин OtTx 1a является «химерой» линейного и дисульфид-богатого пептидов, поэтому получение его рекомбинантного аналога в системе *E. coli* сопровождалось трудностями, свойственными для каждого из типов пептидов.

Тиоредоксин оказался наиболее подходящим белком-помощником при получении токсина OtTx 1a, поскольку он способствует повышению растворимости рекомбинантных белков и формированию дисульфидных связей в цитоплазме штаммов, мутантных по генам тиоредоксин-редуктазы и глутатион-редуктазы (например, Origami B), а также маскированию мембранолитической активности антимикробных пептидов. Введение природного пропептида OtTx 1a в состав гибридного белка Ttx-OtTx 1a, с одной стороны, несколько снизило мембранолитическую активность линейного домена, а с другой – защитило сам линейный домен от внутриклеточных протеаз. Однако даже использование этих подходов позволило нам достичь выхода лишь 500 мкг/л, что в 10 раз ниже, чем в случае OtTx 1a-ІСК, не имеющего цитолитического домена.

При получении полноразмерного токсина OtTx 1a происходило правильное замыкание дисульфидных мостиков, и токсин выделялся из клеток в нативной конформации, при этом его выход был низким. Вероятно, в случае OtTx 1a-ІСК образование нескольких конформаций происходило в связи с накоплением Ttx-OtTx 1a-ІСК в цитоплазме клеток в слишком высокой концентрации. Кроме того, формированию правильной пространственной структуры могут способствовать пропептид и линейный домен OtTx 1a, которые отсутствуют в составе химерного белка Ttx-OtTx 1a-ІСК. Тиоредоксин, несомненно, способствовал однозначному замыканию дисульфидов, так как только в его присутствии процедура рефолдинга приводила к образованию одного продукта.

#### **Спайдерены *Oxuyopes* – новый класс двудоменных токсинов**

В этой работе впервые описаны спайдерены, обладающие уникальной модульной архитектурой. N-Концевая часть OtTx (OtTx-AMP) соответствует однодоменным цитотоксинам, лишенным остатков цистеина. Так, OtTx 1a-AMP несет высокий положительный

заряд (+16 при рН 7, 39% остатков лизина) и в окружении, имитирующем мембранное, склонен формировать структуру амфипатической  $\alpha$ -спирали, что было предсказано расчетными методами, а затем подтверждено экспериментально. На поверхности  $\alpha$ -спирали наблюдается четкое разделение гидрофильного и гидрофобного кластеров (рис. 5). Кроме того, с помощью соосаждения с липосомами было показано, что линейный домен связывается с мембранами. Более того, OtTx 1a-AMP способен разрушать мембраны, поэтому обладает сильной цитолитической активностью. Он эффективно убивает бактериальные и эукариотические клетки в микромолярных концентрациях, и его неизбирательная активность сравнима с токсичностью компонента из яда пчелы – мелиттина. По-видимому, N-концевой домен является главной функциональной частью OtTx 1a.

C-Концевая часть OtTx 1a (OtTx 1a-ICK) содержит типичный мотив ICK, наиболее распространенный среди нейротоксинов пауков. Более того, значимый уровень сходства наблюдается между OtTx 1a-ICK и однодоменными ноттиновыми токсинами из яда того же паука или близкородственных видов. Функциональная роль C-концевого домена в настоящее время не установлена.

#### **Синергизм модулей цитоинсектотоксинов *L. tarabaevi***

Цитоинсектотоксины обладают антимикробной и, что необычно для линейных цитолитиков, высокой инсектицидной активностью. Для токсичности необходимы оба модуля, причем механизм действия СГТ 1a основывается на их синергизме. Скорее всего, N-концевой модуль является ответственным за цитолитическую активность СГТ 1a, а C-концевой играет роль «усилителя». Синергизм в действии фрагментов был ранее обнаружен, например, у модульного токсина CsTx-1 из яда *Cupiennius salei*.

#### **Разнообразие двудоменных токсинов пауков**

К настоящему времени описано 4 структурных класса модульных (или двудоменных) токсинов (табл. 8), выделенных из ядов пауков разных таксономических групп, зачастую находящихся лишь в отдаленном родстве. Интересно, что в яде скорпионов были найдены модульные токсины скорпины, построенные аналогично спайдеринам: они содержат N-концевой антимикробный модуль, за которым следует C-концевой дисульфид-богатый домен.

N-Концевой модуль	C-Концевой модуль	
	AMP	ICK
AMP	AMP+AMP, цитоинсектотоксины из яда <i>L. tarabaevi</i>	AMP+ICK, OtTx из яда <i>O. takobius</i>
ICK	ICK+AMP, LtTx из яда <i>L. tarabaevi</i> , CsTx-1 из яда <i>C. salei</i>	ICK+ICK, CpTx из яда <i>C. punctorium</i> , DkTx из яда <i>Haplopelma schmidti</i>

**Таблица 8. Разнообразие модульных токсинов в ядах пауков.**

В этой работе было рассмотрено разнообразие токсинов структурных типов АМР-ІСК (спайдеринов) и ІСК-ІСК (СрТх-подобных токсинов). В обоих случаях компоненты яда образуют несколько групп, которые представляются результатом недавних дубликаций генов, поскольку последовательности в составе каждой различаются лишь небольшим количеством мутаций. Различия между группами более значительны.

Были установлены 20 аминокислотных последовательностей двудоменных токсинов пауков рода *Oxyopes* (13 у *O. takobius* и 7 у *O. lineatus*). Их можно разделить 2 группы (Ох-I и Ох-II, рис. 6) благодаря вариабельности линейных доменов, которая значительно выше, чем у ІСК-доменов (рис. 8). Аналогичная ситуация наблюдается среди латартоксина *L. tarabaevi*, структура которых «инвертирована» относительно спайдеринов (ІСК+АМР вместо АМР+ІСК). Вероятно, более высокий уровень вариабельности линейных доменов обусловлен их мембрано-активной функцией. Для ее обеспечения достаточно определенного распределения заряженных и гидрофобных остатков, позволяющего формировать амфипатическую  $\alpha$ -спираль и не требующего закрепления специфичных а. о. в конкретных положениях. И наоборот, трехмерная структура ноттиновых доменов поддерживается цистеиновым мотивом, а взаимодействие со специфичной белковой мишенью требует более высокой консервативности последовательности.

Известно 15 полных аминокислотных последовательностей СрТх-подобных токсинов, образующих 3 группы (СрТх 1, СрТх 2 и СрТх 3), а на уровне фрагмента N-концевой аминокислотной последовательности зрелой цепи обнаружена четвертая группа СрТх 4. Зрелые последовательности групп СрТх 1 и СрТх 2 различаются в их С-концевых доменах больше, чем в N-концевых, что может свидетельствовать о функциональной важности последних. Ранее уже отмечалось, что СрТх-N более похожи на нейротоксичный энхансер CsТх-13 из *C. salei*, в то время как СрТх-С проявляют больше сходства с нейротоксинами CsТх-1 и CsТх-9 из того же яда. Вероятно, мы можем рассматривать токсины СрТх как химеры, обладающие «самоусиливающей» активностью.

#### **Безинтронные гены двудоменных токсинов**

Общим свойством генов двудоменных токсинов пауков, принадлежащих к родам *Cheiracanthium* и *Oxyopes*, является отсутствие интронов. Большинство изученных генов коротких пептидных токсинов пауков также не содержат интронов. Исключением является паук *Diguetia canities*, считающийся примитивным. Отсутствие интронов может способствовать поддержанию высокого уровня синтеза токсинов в ядовитых железах. Кроме того, оно может приводить к возрастанию частоты мутаций и, таким образом, к повышению разнообразия токсинов.

## Молекулярная эволюция двудоменных токсинов пауков

Спайдерины (AMP+ICK), скорее всего, образовались в результате вставки линейного N-концевого домена в предковый ноттиновый токсин между пропептидом и зрелым пептидом. Возможно, линейный домен образовался из последовательности интрона, который располагался между экзонами, кодировавшими пропептид и зрелый пептид предкового токсина, или в результате инсерции фрагмента ДНК, кодирующего линейный фрагмент, в предковый ген однодоменного ноттинового пептида.

Можно предположить, что эволюционное появление СрТх-подобных токсинов связано с частичной дупликацией предкового гена, как это, скорее всего, произошло в случае с модульным токсином DkТх из яда *H. schmidtii*. Однако у СрТх-подобных токсинов сходство доменов лишь умеренное, поэтому они, по-видимому, кодируются химерными генами. Их предками могли послужить гены, гомологичные современным генам *ltxa1* и *ltxc* паука *L. singoriensis*. Широко распространенный механизм образования химерных многодоменных белков – перетасовка экзонов, однако у генов модульных токсинов *C. punctatorium* интроны не были обнаружены. Более вероятный эволюционный механизм в данном случае – транскрипционно-опосредованное слияние генов, описанное у млекопитающих.

Ускоренная эволюция не является ярко выраженной тенденцией среди двудоменных токсинов. В случае *Oxyopes* только линейные домены спайдеринов демонстрируют слабую склонность к положительному отбору, в то время как ноттиновые домены подвергаются отрицательному отбору. У паука *C. punctatorium* зрелые двудоменные токсины тоже подвержены сильному отрицательному отбору. Такая тенденция поддерживает консервативность двудоменных токсинов и может свидетельствовать об их функциональной важности. Нельзя исключать, что невыраженность положительного отбора линейного домена спайдеринов и зрелой цепи СрТх-подобных токсинов может быть связана с их цитолитическими свойствами, аналогично другим неспецифичным токсинам.

Большинство коротких цистеин-богатых токсинов ядовитых моллюсков, змей и скорпионов эволюционируют ускоренно, однако такая тенденция у различных животных выражена в разной степени. Ядовитые моллюски *Conus* и змеи – относительно молодые таксоны, в которых под действием положительного отбора происходит «поиск» новых эффективных токсинов. Однако у более древних скорпионов, уже выработавших набор эффективных токсинов в начале своего эволюционного пути, токсины попали под давление отрицательного отбора. Скорее всего, у эволюционно древних пауков наблюдается аналогичная скорпионам ситуация.

## Выводы

1. В яде паука *Oxyopes takobius* обнаружено новое семейство модульных полипептидных токсинов – спайдеринов. Установлены полные аминокислотные последовательности 4 токсинов, состоящих из 108 – 113 аминокислотных остатков. Спайдерины построены из N-концевого линейного и C-концевого дисульфид-богатого доменов. Они обладают мощной антимикробной, инсектицидной и цитолитической активностью, обусловленной линейным доменом.
2. Яд паука *Cheiracanthium punctorium* является уникальным по молекулярному составу с преобладанием модульных CrTx-подобных токсинов, состоящих из двух дисульфид-богатых доменов. Выделены 3 новых токсина с высокой инсектицидной активностью, для двух из которых определены полные аминокислотные последовательности из 131 аминокислотного остатка.
3. Исследована активность линейных модулей цитоинсектотоксина 1a из яда паука *Lachesana tarabaevi*. Для инсектицидной активности токсина необходимо присутствие обоих модулей, высокая антимикробная активность обеспечивается синергией двух фрагментов.
4. Анализ кДНК из ядовитых желез пауков *O. takobius*, *Oxyopes lineatus* и *C. punctorium* позволил идентифицировать 15 последовательностей спайдеринов и 12 последовательностей CrTx-подобных токсинов. Определены последовательности генов, кодирующих двудоменные токсины *O. lineatus* и *C. punctorium*. Показано, что они не содержат интронов.
5. Анализ механизмов молекулярной эволюции двудоменных токсинов *Oxyopes* и *C. punctorium* показало, что они подвержены действию отрицательного отбора. Предположено, что в ходе эволюции гены модульных токсинов образовались из генов однодоменных токсинов.

## Список публикаций по теме диссертации

### Статьи

1. Vassilevski A.A., Sachkova M.Y., Ignatova A.A., Kozlov S.A., Feofanov A.V., Grishin E.V. Spider toxins comprising disulfide-rich and linear amphipathic domains: a new class of molecules identified in the lynx spider *Oxyopes takobius*. *FEBS J.* 2013, 280, 6247–6261.
2. Sachkova M.Y., Slavokhotova A.A., Grishin E.V., Vassilevski A.A. Genes and evolution of two-domain toxins from lynx spider venom. *FEBS Lett.* 2014, 588, 740–745.
3. Sachkova, M.Y., Slavokhotova, A.A., Grishin, E.V., Vassilevski A.A. Structure of the yellow sac spider *Cheiracanthium punctorium* genes provides clues to evolution of insecticidal two-domain knottin toxins. *Insect Mol. Biol.* 2014, doi: 10.1111/imb.12097.

### Тезисы докладов

1. Сачкова М.Ю., Василевский А.А., Егорова Н.С., Гришин Е.В. Изучение активности нового модульного токсина SpdTx из яда паука *Oxyopes takobius*. XXIII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 7 – 10 февраля 2011, Москва, Россия.
2. Сачкова М.Ю., Василевский А.А., Козлов С.А., Гришин Е.В. Новый модульный токсин OtTx из яда паука *Oxyopes takobius*. V Российский симпозиум «Белки и пептиды», 8 – 12 августа 2011, Петрозаводск, Россия.
3. Сачкова М.Ю., Славохотова А.А., Василевский А.А., Гришин Е.В. Изучение организации генов двудоменных токсинов пауков рода *Oxyopes*. XXIV Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 7 – 9 февраля 2012, Москва, Россия.
4. Sachkova M., Vassilevski A., Grishin E. Spider toxin OtTx from *Oxyopes takobius* venom is the first member of a novel class of modular toxins. 37 конгресс Федерации Европейских биохимических обществ, 4 – 9 сентября 2012, Севилья, Испания.
5. Сачкова М.Ю., Славохотова А.А., Василевский А.А., Гришин Е.В. Гены двудоменных токсинов пауков не содержат интронов. V Международная школа молодых ученых по молекулярной генетике «Непостоянство генома», 3 – 7 декабря 2012, Москва – Звенигород, Россия.

6. Сачкова М.Ю., Ковальчук С.И., Василевский А.А., Гришин Е.В. Структурно-функциональные исследования цитоинсектотоксинов из яда паука *Lachesana tarabaevi*, VI Российский симпозиум «Белки и пептиды», 11 – 15 июня 2013, Уфа, Россия.
7. Sachkova M.Y., Slavokhotova A.A., Vassilevski A.A., Grishin E.V. Spider genes encoding two-domain toxins. 38 конгресс Федерации Европейских биохимических обществ, 6 – 11 июля 2013, Санкт-Петербург, Россия.
8. Сачкова М.Ю., Славохотова А.А., Гришин Е.В., Василевский А.А. Гены и эволюция двудоменных пептидных токсинов пауков, XXVI Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 10 – 14 февраля 2014, Москва, Россия.