

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова
Дальневосточного отделения Российской академии наук

На правах рукописи

Кветкина Александра Николаевна

IQ-пептиды Кунитц-типа морских анемонов рода *Heteractis*

Специальность 02.00.10 – Биоорганическая химия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научные руководители:

к.х.н., доцент, Лейченко Елена Владимировна

к.м.н., доцент, Исаева Марина Петровна

ВЛАДИВОСТОК – 2021

Оглавление

Оглавление	2
Введение	5
1 Обзор литературы.....	8
1.1 Структурно-функциональные особенности пептидов Кунитц-типа ядовитых животных ..	8
1.1.1 Структура и функция пептидов Кунитц-типа.....	8
1.1.2 Представленность пептидов Кунитц-типа в ядах животных	12
1.2 Мультигенные семейства и разнообразие пептидов Кунитц-типа ядовитых животных ...	16
1.2.1 Мультигенные семейства пептидов Кунитц-типа змей.....	16
1.2.2 Мультигенные семейства пептидов Кунитц-типа актиний.....	22
1.2.3 Мультигенные семейства пептидов Кунитц-типа других групп животных (паукообразные, земноводные, моллюски)	27
1.2.3.1 Мультигенные семейства пептидов Кунитц-типа пауков	27
1.2.3.2 Мультигенные семейства пептидов Кунитц-типа скорпионов.....	30
1.2.3.3 Мультигенные семейства пептидов Кунитц-типа лягушек.....	32
1.2.3.4 Мультигенные семейства пептидов Кунитц-типа моллюсков-конусов.....	33
1.2.4 Эволюционные аспекты разнообразия пептидов Кунитц-типа	35
1.3 Молекулярные мишени и биологическая активность пептидов Кунитц-типа ядовитых животных	37
Заключение	39
2 Результаты и обсуждение	40
2.1 Изучение представленности и разнообразия IQ-пептидов Кунитц-типа актиний <i>H. crista</i> и <i>H. magnifica</i>	40
2.1.1 Идентификация последовательностей транскриптов, кодирующих IQ-пептиды.....	40
2.1.2 Установление структурной организации генов IQ-пептидов	45
2.1.3 Сравнительный анализ изоформ IQ-пептидов.....	47
2.1.4 Филогенетический анализ и электростатический потенциал IQ-пептидов.....	51
2.2 Получение и изучение пространственной организации рекомбинантных аналогов IQ- пептидов	54
2.2.1 Экспрессия и выделение рекомбинантных аналогов IQ-пептидов	54
2.2.2 Изучение пространственной организации IQ-пептидов методом КД-спектроскопии	58
2.2.2.1 Расчет элементов вторичной структуры IQ-пептидов	58
2.2.2.2 Влияние температуры на пространственную организацию IQ-пептидов.....	60
2.3 Изучение биологической активности IQ-пептидов.....	61
2.5.1 Определение констант ингибирования трипсина IQ-пептидами.....	62

2.3.2 Исследование взаимодействия IQ-пептидов с сериновыми протеазами	63
2.3.3 Исследование нейропротективной активности IQ-пептидов	68
3 Материалы и методы.....	72
3.1 Материалы и оборудование	72
3.1.1 Материалы.....	72
3.1.2 Оборудование.....	73
3.1.3 Биологический материал.....	74
3.2 Методы	74
3.2.1 Идентификация транскриптов, кодирующих IQ-пептиды	74
3.2.1.1 Выделение РНК и синтез кДНК <i>H. crista</i> и <i>H. magnifica</i>	74
3.2.1.2 Амплификация транскриптов, кодирующих IQ-пептиды	75
3.2.1.3 Электрофорез фрагментов ДНК.....	75
3.2.1.4 Получение генетических конструкций на основе вектора pTZ57R/T	75
3.2.1.5 Отбор колоний, содержащих рекомбинантную плазмиду	76
3.2.1.6 Секвенирование ДНК.....	76
3.2.1.7 Выделение плазмидной ДНК.....	76
3.2.1.8 Глубокое секвенирование ампликонов	76
3.2.1.9 Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей.....	77
3.2.2 Установление структуры гена IQ-пептидов.....	77
3.2.3 Филогенетический анализ.....	77
3.2.4 Компьютерное моделирование IQ-пептидов и анализ молекулярного электростатического потенциала	78
3.2.6 Получение рекомбинантных пептидов.....	78
3.2.6.1 Получение рекомбинантных конструкций на основе вектора pET32b(+)	78
3.2.6.2 Отбор колоний, содержащих рекомбинантную плазмиду	79
3.2.6.3 Гетерологичная экспрессия	79
3.2.6.4 Электрофорез в ПААГ	79
3.2.6.5 Выделение гибридного белка методом металл-аффинной хроматографии	79
3.2.6.6 Измерение концентрации белка по спектру поглощения.....	80
3.2.6.7 Гидролиз гибридного рекомбинантного белка.....	80
3.2.6.8 Выделение рекомбинантного пептида методом ОФ ВЭЖХ	80
3.2.6.9 ¹ H ЯМР спектры.....	80
3.2.6.10 Спектры кругового дихроизма	81
3.2.7 Исследование биологической активности пептидов.....	81
3.2.7.1 Определение константы ингибирования трипсина	81

3.2.7.2 Установление взаимодействия с сериновыми протеазами.....	81
3.2.7.3 Электрофизиологические исследования	82
3.2.7.3 Определение цитопротективной активности в модели 6-ОНДА-индуцированной токсичности.....	83
3.2.7.4 Определение содержания активных форм кислорода (АФК)	84
3.2.7.5 Определение цитопротективной активности в модели β -амилоид-индуцированной токсичности.....	84
Заключение	85
Выводы	87
Список сокращений и условных обозначений	88
Список литературы	90
Список публикаций по теме диссертации	102

Введение

Поиск новых биологически активных пептидов, входящих в состав ядовитого секрета морских и наземных животных, и исследование их структурно-функциональных взаимосвязей является актуальным и перспективным направлением биоорганической химии и современной токсикологии. В этом контексте пептиды структурного семейства Кунитца являются одним из наиболее интересных объектов вследствие их широкой представленности в ядах животных, а также способности взаимодействовать с различными мишенями (сериновые протеазы, ионные каналы, рецепторы), участвующими во многих физиологических процессах, таких как воспаление, свертываемость крови, деградация клеточных белков, передача болевых сигналов и другие. Богатым источником пептидов Кунитц-типа являются морские кишечнополостные – морские анемоны (актинии), ядовитый секрет которых содержит множество изоформ различных биологически активных пептидов. Предполагается, что в процессе эволюции морских анемонов гены, кодирующие пептиды Кунитц-типа, претерпевали многократную дупликацию, которая сопровождалась точечными мутациями и формированием мультигенных семейств.

Несмотря на интенсивное использование современных протеомных и геномных подходов к изучению состава ядов животных, мало что известно о природе разнообразия изоформ пептидов Кунитц-типа, продуцируемых актиниями. Установлено, что пептиды Кунитц-типа актинии *Heteractis crispa* кодируются мультигенным GS-семейством, которое включает четыре группы генов HCGS-, HCRG-, HCGG- и HCIQ-пептидов. Показано, что некоторые из охарактеризованных пептидов обладают анальгетической, антигистаминной и противовоспалительной активностью, что обусловлено их взаимодействием с ионными каналами и сериновыми протеазами, участвующими в различных физиологических процессах. Группа HCIQ (IQ-пептиды *H. crispa*) была представлена только одним предшественником с частично идентифицированной последовательностью, которая отличалась от представителей других групп заменами на С-конце сигнального пептида, наличием пропептида с сайтом расщепления Lys-Arg и двух дополнительных остатков Ile-Gln на N-конце зрелого пептида. Следовательно, генетические и структурные исследования полиморфных вариантов этих пептидов представляют значительный теоретический и практический интерес, поскольку обеспечивают понимание взаимосвязи между особенностями их структуры и способностью взаимодействовать с различными мишенями.

Целью настоящей работы являлось структурно-функциональное исследование нового IQ-подсемейства пептидов Кунитц-типа актиний рода *Heteractis* (*H. crispa* и *H. magnifica*).

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Получить нуклеотидные последовательности, кодирующие IQ-пептиды Кунитц-типа, и провести их структурный и филогенетический анализ.
2. Разработать эффективные системы рекомбинантной продукции IQ-пептидов.
3. Определить содержание элементов вторичной структуры и изучить конформационную стабильность IQ-пептидов в зависимости от температуры.
4. Изучить взаимодействие IQ-пептидов с сериновыми протеазами методом поверхностного плазмонного резонанса и определить их трипсинингибирующую активность.
5. Определить нейропротективную активность IQ-пептидов в моделях *in vitro*.

Научная новизна и практическая ценность работы. В данной работе впервые установлены нуклеотидные последовательности, кодирующие IQ-пептиды актиний *H. crispa* и *H. magnifica*, которые являются представителями комбинаторной библиотеки пептидов Кунитц-типа актиний. Важным отличием предшественников IQ-пептидов от других пептидов Кунитц-типа актиний рода *Heteractis* является наличие пропептида, содержащего протеолитический сайт Lys-Arg, характерный для токсинов ядовитого секрета этих животных. Предполагается, что появление пропептида в структуре предшественников IQ-пептидов может быть связано с их вовлечением в состав яда в качестве токсинов (рекруитмент). Впервые установлена экзон-интронная структура генов IQ-пептидов. Показано, что гены IQ-пептидов образуют отдельное подсемейство в составе мультигенного GS-семейства.

Впервые получены и охарактеризованы рекомбинантные аналоги IQ-пептидов *H. crispa* и *H. magnifica*, изучена их конформационная стабильность и определены константы ингибирования трипсина. Исследовано взаимодействие IQ-пептидов с различными сериновыми протеазами, определены константы образования и диссоциации комплексов, рассчитаны термодинамические параметры процесса комплексообразования. Впервые показано, что пептиды Кунитц-типа способны снижать токсическое действие 6-гидроксидофамина и β -амилоида на клетки нейробластомы мыши.

Полученные результаты значительно расширяют знания о разнообразии транскриптов, кодирующих пептиды Кунитц-типа актиний рода *Heteractis*, и об эволюционных процессах, участвующих в его формировании, а способность IQ-пептидов взаимодействовать с различными сериновыми протеазами и проявлять цитопротективную активность позволяет рассматривать их в качестве потенциальных соединений для создания фармакологических препаратов.

Методология и методы исследования. Теоретическую основу работы составляют научные статьи отечественных и зарубежных авторов, посвященные проблеме исследования биологически активных пептидов Кунитц-типа ядовитых животных, кодируемых мультигенными семействами. Методологическую основу исследования формируют методы

молекулярной биологии, генной инженерии, хроматографические и спектрофотометрические методы, а также методы электрофизиологии и биосенсорного анализа. Для проведения филогенетического анализа и моделирования были использованы программы MEGA, VectorNTI, Modeller, Chimera и MOE. Для расчета статистически достоверных данных использовали метод Стьюдента.

Степень достоверности результатов. Результаты исследования получены на современном оборудовании с использованием стандартизированных методик и программ.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. В транскриптомах тканей щупалец актиний *H. crista* и *H. magnifica* представлены транскрипты, кодирующие различные изоформы нового подсемейства IQ-пептидов Кунитц-типа. Предшественники IQ-пептидов имеют четыре структурных варианта. Большинство предшественников IQ-пептидов содержат пропептид с сайтом расщепления, характерным для токсинов ядовитого секрета актиний.

2. Гены HSIQ- и HMIQ-пептидов имеют экзон-интронную структуру и образуют отдельное подсемейство внутри мультигенного GS-семейства пептидов Кунитц-типа.

3. Рекомбинантные HSIQ- и HMIQ-пептиды обладают выраженной пространственной структурой с практически одинаковым содержанием элементов вторичной структуры и высокой термостабильностью.

4. Рекомбинантные HSIQ- и HMIQ-пептиды образуют прочные комплексы с сериновыми протеазами, обладают трипсинингибирующей и нейропротективной активностью.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на: VI Международной школе молодых ученых «Геномика и системная биология» (Звенигород, 2014); 40-м конгрессе FEBS «The Biochemical Basis of Life» (Берлин, 2015); Русско-корейском симпозиуме «Together to effectively acting medicines» (Владивосток, 2016); XVI Всероссийской молодежной школе-конференции «Актуальные проблемы химии и биологии» (Владивосток, 2017); 7-м Международном симпозиуме «Химия и химическое образование» (Владивосток, 2017); 3-м международном симпозиуме «Life Sciences» (Владивосток, 2018); 19-м Европейском конгрессе IST «Basic Science and Clinical aspects of Animal, Plant and Microbial Toxins» (Ереван, 2018); XVII Всероссийской школе-конференции по актуальным проблемам химии и биологии (Владивосток, 2020).

Автором опубликовано 12 работ по теме диссертации, включая 4 научные статьи в журналах, рекомендованных ВАК, и 8 материалов конференций.

1 Обзор литературы

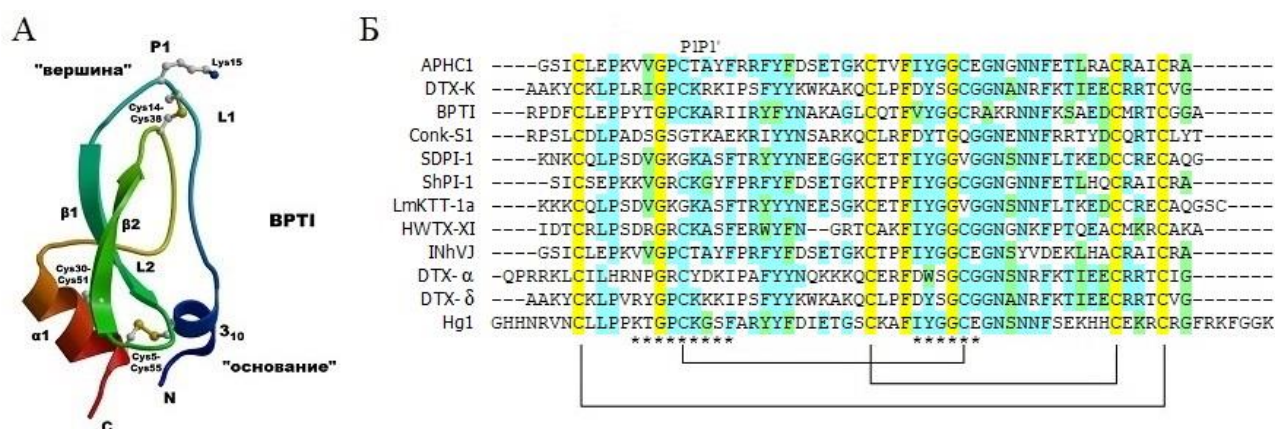
1.1 Структурно-функциональные особенности пептидов Кунитц-типа ядовитых животных

Пептиды Кунитц-типа являются одним из наиболее хорошо изученных структурных семейств, которое традиционно относят к ингибиторам сериновых протеаз [1]. Согласно базе данных MEROPS [2] ингибиторы протеаз Кунитц-типа образуют семейство I2, клан IB, классическим представителем которого является BPTI (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor), выделенный из поджелудочной железы быка *Bos taurus*, и охарактеризованный Д. Нортропом и М. Кунитцем в 1936 году [3]. Некоторые представители этого структурного семейства в процессе эволюции приобрели способность модулировать функциональную активность различных типов ионных каналов и рецепторов (K_v , Na_v , Ca_v , TRPV1, V2R), вследствие чего они были названы токсинами Кунитц-типа [1].

1.1.1 Структура и функция пептидов Кунитц-типа

Большинство однодоменных пептидов Кунитц-типа представляет собой полипептидную цепь, состоящую из 56–80 аминокислотных остатков (а.о.), включая шесть высоко консервативных остатков Cys, которые обеспечивают формирование компактной и чрезвычайно стабильной пространственной структуры (рисунок 1, А, Б) [4]. Кунитц-домен содержит две петли (L1 и L2), на которых располагаются сайты взаимодействия с протеазами. Петле L1 обычно предшествует короткая 3_{10} -спираль на N-конце пептида. За петлей L1 всегда следует два β -стренда (β_1 и β_2), развернутых друг относительно друга на 180° (рисунок 1, А). На С-конце молекулы, вблизи 3_{10} -спирали, находится более длинная α -спираль, которая соединяется с β_2 -стрендом с помощью петли L2 [5].

Характерной особенностью Кунитц-фолда является одинаковая топология расположения дисульфидных связей (Cys^I-Cys^{VI} , $Cys^{II}-Cys^{IV}$, $Cys^{III}-Cys^V$) у всех представителей этого семейства. Две дисульфидные связи (Cys^I-Cys^{VI} , $Cys^{II}-Cys^{IV}$) образуются в основании молекулы и играют важную роль в формировании фолда, тогда как третья ($Cys^{III}-Cys^V$) связывает петли L1 и L2, стабилизируя их [4]. Несмотря на консервативность расположения остатков Cys, обнаружены пептиды Кунитц-типа с отклонениями от этой архитектуры. Так, в яде моллюска конуса *Conus striatus*, скорпиона *Lychas mucronatus* и лягушки *Hyla annectans* обнаружены пептиды Кунитц-типа, у которых отсутствует дисульфидная связь $Cys^{II}-Cys^{IV}$ [6–9]. Кроме того, в последовательностях пептидов скорпиона, SDPI-1 и SDPI-2, обнаружены дополнительные остатки Cys на С-конце молекул, которые участвуют в образовании новой дисульфидной связи [8].



(А) Модель пространственной структуры BPTI (PDB ID 5PTI [10] в виде ленточной диаграммы [1]. (Б) Выравнивание аминокислотных последовательностей пептидов Кунитц-типа. APHC1 из актинии *H. crisper*, ShPI-1 из *Stichodactylus helianthus*, HWTX-XI из паука *Ornithoctonus huwena*, ConK-S1 из моллюска *C. striatus*, LmKTT-1a, SDPI из скорпиона *L. mucronatus*, DTX-K из змеи *Dendroaspis polylepis*, BPTI из быка *B. taurus*. Топология расположения дисульфидных связей показана квадратными скобками снизу. P1 и P1' – остатки реактивного сайта взаимодействия с протеазами. Консервативные и идентичные остатки выделены голубым и желтым цветом соответственно

Рисунок 1 – Структура пептидов Кунитц-типа

Определение пространственной организации молекулы является важной задачей в изучении пептидов Кунитц-типа. Использование достижений ЯМР-спектроскопии и рентгеноструктурного анализа позволяет получать детальную информацию не только о структуре пептидов, но и о комплексах пептидов с молекулярными мишенями [11]. В настоящее время методом ЯМР-спектроскопии установлены трехмерные структуры таких пептидов Кунитц-типа, как ShPI-1 из морской анемоны *Stichodactylus helianthus* [12], DTX-K [13] и DTX-I [14] из черной мамбы *Dendroaspis polylepis*, В-цепь β2-бунгаротоксина из Южнокитайского многополосого крайта *Bungarus multicinctus* [15], BF9 из ленточного крайта *Bungarus fasciatus* [16], HWTX-XI из паука *Ornithoctonus huwena* [17], LmKTT-1a из скорпиона *L. mucronatus* [9] и конкуницина (ConK-S1) из конуса *C. striatus* [18]. Кристаллические структуры кальциклудина (CaC) [19] и DTX-α [20] из узкоголовой мамбы *Dendroaspis angusticeps*, а также текстилина (Txln 1) из восточной коричневой змеи *Pseudonaja textilis* [21] были получены с помощью рентгеноструктурного анализа. Структура большинства этих пептидов соответствует структуре BPTI; отклонения от классической архитектуры Кунитц-фолда являются редкими и связаны с изменениями небольших фрагментов молекулы.

С помощью рентгеноструктурного анализа также были получены кристаллические структуры комплексов некоторых пептидов Кунитц-типа с протеазами. Известно, что основной функцией пептидов Кунитц-типа является ингибирование преимущественно сериновых протеаз, поэтому получение комплексов пептидов с ферментами и выявление контактов между ними – важная задача для установления механизма взаимодействия ингибитора с протеазой.

Такие комплексы были получены для ShPI-1 с трипсином и α -химотрипсином [22] и Txln 1 с плазмином [23]. Стоит отметить, что Txln 1 является первым пептидом Кунитц-типа, для которого получен комплекс с плазмином.

Анализ комплексов пептидов Кунитц-типа с протеазами показал, что взаимодействие пептидов с активным центром фермента осуществляется посредством аминокислотных остатков сайта сильных взаимодействий, обозначенных как P3, P2, P1, P1', P2', P3' (остатки 13-18 в BPTI), которые располагаются на протеаза-связывающей петле L1 (рисунок 1, А). Аминокислотные остатки в положениях P1-P1' формируют так называемый реактивный сайт и находятся в наиболее открытой области петли.

Однако большинство фермент-ингибиторных контактов создается боковой цепью остатка в P1-положении, который глубоко проникает в активный центр фермента и определяет специфичность распознавания протеазы ингибитором и энергетические параметры образующегося комплекса [24]. Так, для ингибиторов трипсина характерны положительно заряженные остатки Lys или Arg в P1-положении, для ингибиторов α -химотрипсина – гидрофобные остатки Met, Leu или ароматические остатки Phe, Trp или Tyr [25]. Изучение комплексов мутантных по P1-положению аналогов BPTI с трипсином показало, что замена Lys15 на Arg приводит к незначительному снижению константы ассоциации комплекса, тогда как любой другой остаток снижает это сродство минимум на шесть порядков [26]. С другой стороны, замена Lys15 на Leu или на ароматические остатки повышает сродство пептида к α -химотрипсину, а замена Lys15 на остатки с разветвленными боковыми цепями (Val, Thr или Ile) повышает сродство к эластазе нейтрофилов человека (ЭНЧ). Исследование ингибирующей активности HWTX-XI из паука *O. huwena* в отношении трипсина показало, что основную роль в ингибировании также играет остаток Lys14 в P1-положении; небольшой вклад в связывание с ферментом вносят остатки Arg12, Ala15, Ser16 и Phe17 [27]. Замена Lys14Asn в HWTX-XI приводила к 5-кратному снижению ингибирующей активности, тогда как при замене Lys14Ala произошла полная потеря связывания пептида с ферментом. Наличие остатка Thr в P1-положении InhVJ из актинии *H. crispa*, не характерного для пептидов Кунитц-типа, привело к снижению ингибирующей активности в отношении трипсина и α -химотрипсина по сравнению с пептидами Кунитц-типа актиний, в P1-положении которых присутствует Arg или Lys, и отсутствию связывания пептида с калликреином, плазмином и тромбином [28,29]. Интересно, что APHC1-APHC3 и HCRG21 из *H. crispa* с остатком Thr в P1-положении не только ингибируют трипсин, но и проявляют модулирующую активность по отношению к TRPV1 каналу [30–33].

На энергию ассоциации ингибитора с ферментом также влияет природа аминокислотного остатка в P1'-положении. Для большинства пептидов Кунитц-типа

характерно наличие Ala (реже Gly) в этой позиции (рисунок 1, Б). Вариабельность этого остатка наблюдается у пептидов Кунитц-типа, не способных ингибировать протеазы, таких как дендротоксины змей [34]. Вероятно, отсутствие этих остатков в P1'-положении является одной из ключевых структурных особенностей, которая препятствует ингибированию протеаз [35].

Помимо сайта сильных взаимодействий на протеаза-связывающей петле, во взаимодействии с ферментами также участвует сайт слабых взаимодействий (остатки 34-39 в BPTI), который располагается на петле L2. Аминокислотные остатки этого сайта создают многочисленные ван-дер-ваальсовы взаимодействия и образуют водородные связи с аминокислотными остатками фермента, что дополнительно стабилизирует образующийся фермент-ингибиторный комплекс [1]. Показано, что остаток Arg38 в BPTI образует две водородные связи с Asn97 трипсина и вносит основной вклад в свободную энергию связывания, тогда как наличие отрицательно заряженного остатка Glu38 в InhVJ не влияет на нее. В то же время, остаток Glu45 вносит существенный вклад в энергию образования комплекса InhVJ-трипсин, в отличие от положительно заряженного остатка Lys45 в BPTI [29].

Некоторые пептиды Кунитц-типа в процессе эволюции частично или полностью утратили способность ингибировать протеазы и приобрели способность блокировать K_v каналы. Так, структурно-функциональный анализ DTX-α и DTX-δ из *D. angusticeps* и DTX-K из *D. polylepis* позволил установить участки, вовлекаемые во взаимодействие с K_v каналами. Показано, что для ингибирования активности K_v1.1, K_v1.2 и K_v1.6 дендротоксину DTX-α необходимы остатки Arg3, Arg4, Leu6, Lys5, Ile8 и Leu9 на N-конце молекулы. Среди этих остатков Lys5 и Leu9 являются наиболее функционально значимыми, их замена на Ala приводила к потере сродства токсина с каналом [36]. Дендротоксин DTX-K связывается с K_v1.1 каналом посредством Lys3 и Lys6 и остатков 24-28 в области β-неупорядоченной петли [37,38]. Методом сайт-направленного мутагенеза установлено семь остатков (Lys3, Tyr4, Lys6, Leu7, Pro8, Arg10, Lys26), необходимых для связывания DTX-δ с K_v1.1 [39].

Анализ влияния мутантных форм HWTX-XI в отношении K_v показал, что, подобно дендротоксинам, остаток Leu6 вносит основной вклад в ингибирование каналов. Так, замена этого остатка на Ala или Tyr приводила к 200-кратному снижению ингибирующей активности пептида. Не менее важным оказался остаток Arg5. Его замена на Ile вызывала 14-кратное падение блокирующей активности пептида. Ни одна мутация в области протеаза-связывающей петли HWTX-XI не оказывала влияния на блокирование K_v канала. В свою очередь, замены N-концевых остатков, являющихся ключевыми для блокирования каналов, не влияли на трипсинингибирующую активность. Очевидно, в структуре HWTX-XI присутствует два независимых сайта, каждый из которых отвечает за проявление своей функции [27]. Таким образом, аминокислотные остатки на N-конце молекулы являются важными для проявления

нейротоксического действия дендротоксинов и HWTX-XI. С другой стороны, исследование влияния конкунитина-1 (ConK-S1) из *C. striatus* на мутантную форму канала *Shaker* показало, что для его блокирования необходимы Arg49, Tyr51, Arg55 и Tyr59 на С-конце молекулы пептида, а также Arg34 в области сайта слабых взаимодействий [18]; замены остатков Lys56, Arg57, Phe61 и Lys63 в области С-конца пептида Hg1 из скорпиона *Hadrurus gertschi* приводили к снижению его блокирующей способности в отношении $K_v1.3$ в 94, 49, 58 и 74 раза соответственно. Следовательно, для ингибирования токов K_v каналов пептидами Hg1 и ConK-S1 важную роль играют аминокислотные остатки на С-конце молекулы.

Таким образом, компактная и чрезвычайно стабильная пространственная структура пептидов Кунитц-типа с функционально значимыми аминокислотными остатками, локализованными на поверхности молекул, обуславливает их способность ингибировать сериновые протеазы и блокировать K_v каналы. Регуляция этих важных мишеней, широко представленных в организмах животных, может указывать на то, что пептиды Кунитц-типа являются одними из самых распространенных молекул в животном мире, включая наземных и морских ядовитых животных.

1.1.2 Представленность пептидов Кунитц-типа в ядах животных

Пептиды Кунитц-типа обнаружены повсеместно, включая животных, микроорганизмы и даже вирусы. В то же время, интерес исследователей преимущественно направлен на изучение пептидов Кунитц-типа наземных и морских ядовитых животных [40]. На рисунке 2 показаны ядовитые животные, в секрете которых обнаружены пептиды Кунитц-типа. Наряду с другими структурными семействами пептидов и белков, представленность пептидов Кунитц-типа в ядовитом секрете животных разных систематических групп варьирует, что, вероятно, связано с особенностями их питания и среды обитания.

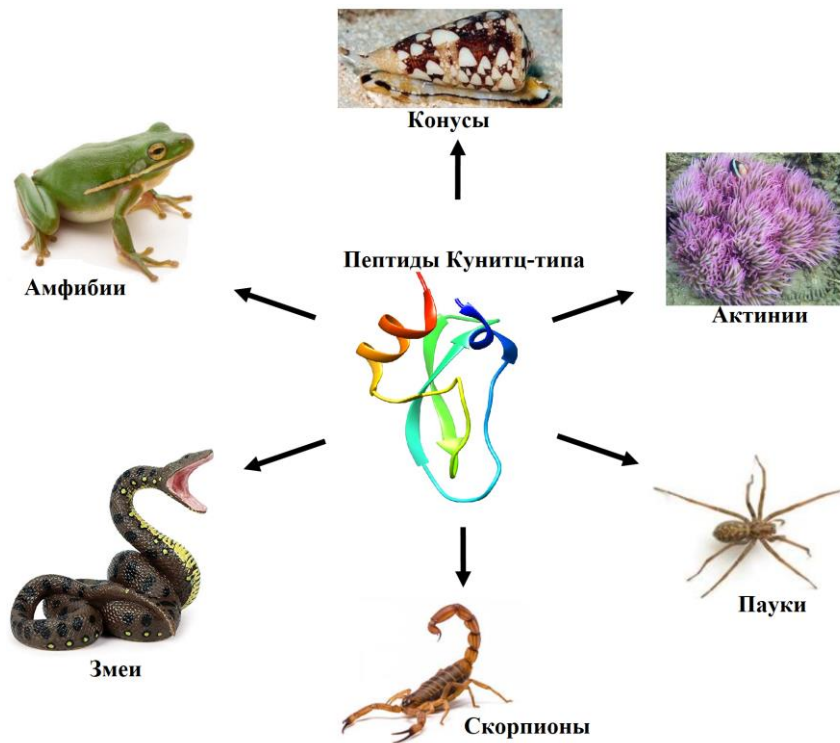
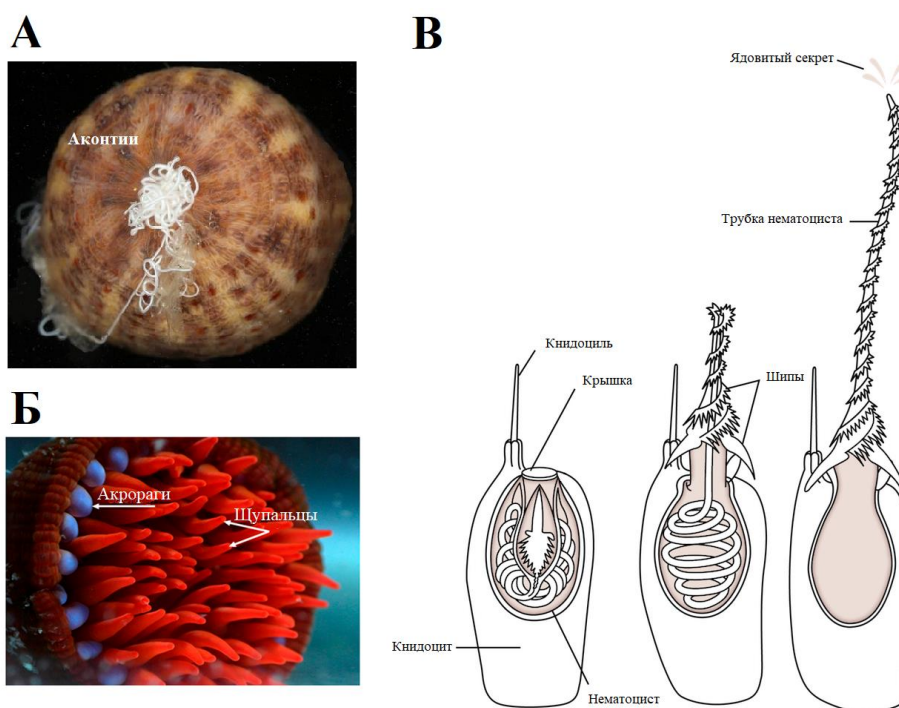


Рисунок 2 – Представленность пептидов Кунитц-типа в ядовитых животных

Известно, что актинии обитают исключительно в водной среде и ведут преимущественно прикрепленный образ жизни, вследствие чего они вынуждены вырабатывать секрет, который позволяет им добывать пищу и защищаться от других хищников [41]. Ввиду отсутствия централизованной ядовитой железы эти животные продуцируют ядовитый секрет в тканях тела (щупальцах, акрорагах, аконтиях) посредством специализированных жалящих клеток (книдоцитов) и эктодермальных железистых клеток (рисунок 3) [42,43]. Попадая в ткани жертвы, компоненты яда подвергаются действию различных протеаз, разрушающих пептидные и белковые токсины. Поэтому ядовитый секрет актиний содержит, помимо нейро- и пороформирующих токсинов, большое количество пептидов Кунитц-типа [44–48]. Методами выделительной химии белка, а затем и протеомного и транскриптомного подходов были выделены и идентифицированы пептиды Кунитц-типа актиний *H. crispa* (= *Radianthus macrodactylus*, InhVJ, Jn-IV, APHC1-APHC3, HCRG1, HCRG2, HCRG21) [29,30,46,49,50], *Anemonia viridis* (= *A. sulcata*, AsKC) [51,52], *S. helianthus* (SHPI-1, SHPI-2) [53,54] и *Stichodactyla haddoni* (SHTX-3) [44,55]. Интересно, что как в экстрактах актиний, так и на уровне транскриптов пептиды Кунитц-типа представлены в виде множества изоформ. Так, сочетание протеомного и транскриптомного подходов позволило идентифицировать 18 изоформ пептидов Кунитц-типа в *A. sulcata* [51,52], около 33 изоформ HCGS-пептидов обнаружено в *H. crispa* [46], что указывает на разнообразие пептидов Кунитц-типа в ядовитом секрете актиний.



(А) Аконтии (белые нити) на поверхности тела актинии *Calliactis parasitica* [56]. (Б) Акроаги (голубые везикулы) у основания щупалец актинии *Actinia equina* [57]. (В) Схематическое представление структуры книдоцита до и после выброса ядовитого секрета [58]

Рисунок 3 – Основные элементы защитного механизма актиний

Большую группу ядовитых животных, широко распространенных по всему миру, составляют змеи. Их ядовитый секрет вырабатывается специальной ядовитой железой, которая располагается под верхней челюстью. При ловле добычи эти пресмыкающиеся сначала наносят укус, чтобы обездвижить жертву, а затем проглатывают ее. Поэтому в их ядовитом секрете присутствуют как нейрорепаралитические пептиды, так и ингибиторы различных протеаз, включая пептиды Кунитц-типа [34,59,60]. Протеомный анализ ядовитого секрета 132 видов змей показал, что пептиды Кунитц-типа широко представлены в ядах змей семейства Elapidae и подсемейства Viperinae, тогда как в подсемействе Crotalinae они не были обнаружены [60]. В черной мамбе *D. polylepis* пептиды Кунитц-типа, названные дендротоксинами, являются основным компонентом яда и составляют 61% [61], тогда как в ядовитом секрете *Daboia russelii russelii* их около 28% [62], а в *D. angusticeps* – около 16% [63].

Пауки являются второй по численности таксономической группой наземных животных после насекомых и занимают большинство экологических ниш на планете [64]. Согласно базе данных ArachnoServer [65], в настоящее время обнаружено 1561 соединение в 100 видах пауков, что составляет 0,2% от всех известных видов. Однако пептиды Кунитц-типа в составе их ядовитого секрета представлены не так широко, как в ядах змей и актиний. Большинство из них обнаружено в транскриптомах животных рода *Ornithoctonus* [27,66] и крестовика *Araneus*

ventricosus. Так, в *O. huwena* обнаружены транскрипты, кодирующие 34 изоформы пептидов Кунитц-типа, а в *O. hainana* – 11 изоформ [27], тогда как в *A. ventricosus* идентифицировано только три изоформы пептидов Кунитц-типа [67].

Скорпионы, как и пауки, занимают практически все экологические ниши в мире [68]. Их ядовитый секрет преимущественно состоит из пептидных и белковых компонентов, важных для защиты от хищников и ловли добычи [69]. В основном это токсины, действующие на ионные каналы, цитолитические токсины, антимикробные пептиды и протеолитические ферменты [70]. Ингибиторы протеаз в ядах скорпионов представлены двумя семействами пептидов: пептидами Кунитц-типа и пептидами, подобными ингибиторам протеаз аскарид [71]. Использование транскриптомного подхода позволило идентифицировать изоформы пептидов Кунитц-типа в скорпионах рода *Hadrurus* [72], а также *Androctonus bicolor* [73] и *L. mucronatus* [74].

Лягушки, как и жабы, являются первой группой позвоночных животных, совершивших переход из воды на сушу [75]. В течение миллионов лет они адаптировали кожный секрет к выполнению как общих физиологических, так и более специфических функций для защиты от хищников [76]. Кожный секрет амфибий содержит множество различных биологически активных соединений, включая антимикробные пептиды, нейропептиды и ингибиторы протеаз [77–79], которые представлены пептидами семейств Кунитца [78], Казала [80] и Баумана-Бирка [81]. Пептиды Кунитц-типа обнаружены в кожном секрете лягушек *Dyscophus guineti* [78], *Hyla annectans* (аннтоксин, AnnTx) [7], *Hyla simplex* (AnnTx-S2 – AnnTx-S6) [82], *Kassina senegalensis* (KSCI) [83] и *Dryophytes arenicolor* (аренин, ArTx) [84].

Моллюски конусы представляют собой одну из самых многочисленных групп морских беспозвоночных, которая насчитывает более 800 видов [85]. Большинство из них являются специализированными хищниками, которые питаются морскими червями, рыбами и брюхоногими моллюсками [86]. Ядовитый секрет конусов содержит огромное разнообразие небольших пептидов (10–30 а.о.), выполняющих функцию нейротоксинов, действующих на ионные каналы, рецепторы, связанные с G-белками, и транспортеры нейротрансмиттеров [85,87,88]. До недавнего времени был известен только один пептид Кунитц-типа из моллюска *C. striatus*, названный конкунитцином (ConK-S1) [6]. В настоящее время последовательности, кодирующие пептиды Кунитц-типа, обнаружены в транскриптомах *Californiconus californicus* [89], *Conus geographus* [90], *Conus bullatus* [91], *Conus betulinus* [92], *Conus ermineus* [93] и *Conus magus* [94].

Таким образом, пептиды Кунитц-типа широко представлены в ядах змей, актиний, скорпионов и пауков, тогда как в лягушках и моллюсках-конусах они обнаружены лишь у некоторых представителей групп. Наличие нескольких, а в случае змей, скорпионов и актиний множества изоформ пептидов Кунитц-типа, представляет большой интерес для изучения

молекулярно-генетических основ наблюдаемого разнообразия и представленности у ядовитых животных.

1.2 Мультигенные семейства и разнообразие пептидов Кунитц-типа ядовитых животных

1.2.1 Мультигенные семейства пептидов Кунитц-типа змей

Пептиды Кунитц-типа широко представлены в ядах змей семейства Elapidae и подсемейства Viperinae (сем. Viperidae) [34,60,95]. На основании выполняемой функции пептиды Кунитц-типа змей разделяют на две основные группы – ингибиторы протеаз [96,97] и блокаторы ионных каналов [34,98]. Согласно литературным данным, большинство исследованных пептидов Кунитц-типа змей кодируется мультигенными семействами, гены которых состоят из трех экзонов, разделенных интронами [99–103]. Сайты сплайсинга интронов подчиняются каноническому правилу «GT/AG». Первый экзон, как правило, кодирует консервативный сигнальный пептид и несколько остатков зрелого пептида; второй экзон кодирует основную часть зрелого пептида; третий экзон – оставшийся участок зрелого пептида и 3'-нетранслируемую область. Сравнение известных генов пептидов Кунитц-типа змей выявило высокую консервативность в последовательностях интронов. Показано, что в экзонах пептидов Кунитц-типа змей семейства Elapidae под действием положительного отбора находится 53% кодонов, а в таковых семейства Viperidae – 28% [95]. Точечные замены в последовательностях пептидов сконцентрированы в основном в области протеаза-связывающей петли, а также на N- и C-концах молекул.

Среди змей подсемейства Viperinae наиболее полно описано мультигенное семейство ингибиторов протеаз Кунитц-типа из *Vipera ammodytes*. В настоящее время обнаружено восемь представителей Vam-пептидов [73]. Предшественники пептидов состоят из консервативного сигнального пептида (24 а.о.) и зрелого пептида длиной в 61 а.о. для ингибиторов трипсина (VamTi) и 65 а.о. для ингибиторов химо tripsина (VamChi) (рисунок 4). Степень идентичности последовательностей между пептидными группами составляет порядка 80%. Для Vam-пептидов характерно наличие остатков Leu и Lys в P1-положении, типичных для ингибиторов протеаз [35,104].

Другое мультигенное семейство пептидов Кунитц-типа, обнаруженное в транскриптах змей *D. russelii* (*D. russelii russelii* и *D. russelii siamensis*), включает 26 представителей. Предшественники этих пептидов, подобно Vam-пептидам, содержат сигнальный (24 а.о.) и зрелый (60-66 а.о.) пептиды. Анализ последовательностей DrKIn, BBPTI и CBPTI показал наличие полиморфизма остатка в P1-положении, а в случае DrKIn-2 наблюдается замена Cys^{II} на Tug (рисунок 4).

		↓1		20		40		60		72
BBPTI-1	MSSGGLLLLLGLLTLWAE	LTPI	SGH	DRPKFCYLPADP	GECLAHMRSFY	YDS	ESKKCKE	FIYGGCHGNANKF	PSRDKCRQTCGGK	-----
BBPTI-5	MSSGGLLLLLGLLTLWAE	LTPI	SGH	DRPKFCYLPADP	GECLAHMRSFY	YDS	ESKKCKE	FIYGGCHGNANKF	PSRDKCRQTCGASAKGRPT	-----
CBPTI-3	MSSGGLLLLLGLLTLWAE	LTPI	SGH	DRPKFCYLPADP	GECLAHMRSFY	YDS	ESKKCKE	FIYGGCHGNANNF	TRDKCRQTCGRGK	-----
DrKin-3	MSSGGLLLLLGLLTLWAE	LTPI	SGH	DRPKFCYLPADP	GECLAHMRSFY	YDS	ESKKCKE	FIYGGCHGNANNF	TRDKCRQTCGRGK	-----
CBPTI-4	MSSGGLLLLLGLLTLWAE	LTPI	SGH	DRPKFCYLPADP	GECLAHMRSFY	YDS	ESKKCKE	FIYGGCHGNANNF	TRDKCRQTCRAPRKGKGRHT	-----
DrKin	MSSGGLLLLLGLLTLWAE	LTPI	SGH	DRPKFCYLPADP	GECLAHMRSFY	YDS	ESKKCKE	FIYGGCHGNANNF	TRDKCRQTCRAPRKGKGRHT	-----
cVamChi	MSSGGLLLLLGLLTLWAE	LTPI	SGH	DRPKFCYLPADP	GECLAHMRSFY	YDS	ESKKCKE	FIYGGCHGNANNF	TRDKCRQTCGASAKGRPT	-----
VamChi-1	MSSGGLLLLLGLLTLWAE	LTPI	SGH	DRPKFCYLPADP	GECLAHMRSFY	YDS	ESKKCKE	FIYGGCHGNANNF	TRDKCRQTCGASAKGRPT	-----
VamChi-2	MSSGGLLLLLGLLTLWAE	LTPI	SGH	DRPKFCYLPADP	GECLAHMRSFY	YDS	ESKKCKE	FIYGGCHGNANNF	TRDKCRQTCGASAKGRPT	-----
VamChi-3	MSSGGLLLLLGLLTLWAE	LTPI	SGH	DRPKFCYLPADP	GECLAHMRSFY	YDS	ESKKCKE	FIYGGCHGNANNF	TRDKCRQTCGASAKGRPT	-----
VamChi-7	MSSGGLLLLLGLLTLWAE	LTPI	SGH	DRPKFCYLPADP	GECLAHMRSFY	YDS	ESKKCKE	FIYGGCHGNANNF	TRDKCRQTCGASAKGRPT	-----
VamChi-5	MSSGGLLLLLGLLTLWAE	LTPI	SGH	DRPKFCYLPADP	GECLAHMRSFY	YDS	ESKKCKE	FIYGGCHGNANNF	TRDKCRQTCGASAKGRPT	-----
VamTi-4	MSSGGLLLLLGLLTLWAE	LTPI	SGH	DRPKFCYLPADP	GECLAHMRSFY	YDS	ESKKCKE	FIYGGCHGNANNF	TRDKCRQTCGASAKGRPT	-----
cVamTi	MSSGGLLLLLGLLTLWAE	LTPI	SGH	DRPKFCYLPADP	GECLAHMRSFY	YDS	ESKKCKE	FIYGGCHGNANNF	TRDKCRQTCGASAKGRPT	-----
CBPTI-6	MSSGGLLLLLGLLTLWAE	LTPI	SGH	DRPKFCYLPADP	GECLAHMRSFY	YDS	ESKKCKE	FIYGGCHGNANNF	TRDKCRQTCGASAKGRPT	-----
DsKin	MSSGGLLLLLGLLTLWAE	LTPI	SGH	DRPKFCYLPADP	GECLAHMRSFY	YDS	ESKKCKE	FIYGGCHGNANNF	TRDKCRQTCGASAKGRPT	-----
DrKin-4	MSSGGLLLLLGLLTLWAE	LTPI	SGH	DRPKFCYLPADP	GECLAHMRSFY	YDS	ESKKCKE	FIYGGCHGNANNF	TRDKCRQTCGASAKGRPT	-----
DrKin-5	MSSGGLLLLLGLLTLWAE	LTPI	SGH	DRPKFCYLPADP	GECLAHMRSFY	YDS	ESKKCKE	FIYGGCHGNANNF	TRDKCRQTCGASAKGRPT	-----
DrKin-2	MSSGGLLLLLGLLTLWAE	LTPI	SGH	DRPKFCYLPADP	GECLAHMRSFY	YDS	ESKKCKE	FIYGGCHGNANNF	TRDKCRQTCGASAKGRPT	-----
CBPTI-1	MSSGGLLLLLGLLTLWAE	LTPI	SGH	DRPKFCYLPADP	GECLAHMRSFY	YDS	ESKKCKE	FIYGGCHGNANNF	TRDKCRQTCGASAKGRPT	-----
DrKin-I	MSSGGLLLLLGLLTLWAE	LTPI	SGH	DRPKFCYLPADP	GECLAHMRSFY	YDS	ESKKCKE	FIYGGCHGNANNF	TRDKCRQTCGASAKGRPT	-----
CBPTI-5	MSSGGLLLLLGLLTLWAE	LTPI	SGH	DRPKFCYLPADP	GECLAHMRSFY	YDS	ESKKCKE	FIYGGCHGNANNF	TRDKCRQTCGASAKGRPT	-----
BBPTI-3	MSSGGLLLLLGLLTLWAE	LTPI	SGH	DRPKFCYLPADP	GECLAHMRSFY	YDS	ESKKCKE	FIYGGCHGNANNF	TRDKCRQTCGASAKGRPT	-----
BBPTI-4	MSSGGLLLLLGLLTLWAE	LTPI	SGH	DRPKFCYLPADP	GECLAHMRSFY	YDS	ESKKCKE	FIYGGCHGNANNF	TRDKCRQTCGASAKGRPT	-----
DrKin-6	MSSGGLLLLLGLLTLWAE	LTPI	SGH	DRPKFCYLPADP	GECLAHMRSFY	YDS	ESKKCKE	FIYGGCHGNANNF	TRDKCRQTCGASAKGRPT	-----
CBPTI-2	MSSGGLLLLLGLLTLWAE	LTPI	SGH	DRPKFCYLPADP	GECLAHMRSFY	YDS	ESKKCKE	FIYGGCHGNANNF	TRDKCRQTCGASAKGRPT	-----
DrKin-II	MSSGGLLLLLGLLTLWAE	LTPI	SGH	DRPKFCYLPADP	GECLAHMRSFY	YDS	ESKKCKE	FIYGGCHGNANNF	TRDKCRQTCGASAKGRPT	-----
BBPTI-2	MSSGGLLLLLGLLTLWAE	LTPI	SGH	DRPKFCYLPADP	GECLAHMRSFY	YDS	ESKKCKE	FIYGGCHGNANNF	TRDKCRQTCGASAKGRPT	-----
DrKin-8	MSSGGLLLLLGLLTLWAE	LTPI	SGH	DRPKFCYLPADP	GECLAHMRSFY	YDS	ESKKCKE	FIYGGCHGNANNF	TRDKCRQTCGASAKGRPT	-----
BPTI-7	MSSGGLLLLLGLLTLWAE	LTPI	SGH	DRPKFCYLPADP	GECLAHMRSFY	YDS	ESKKCKE	FIYGGCHGNANNF	TRDKCRQTCGASAKGRPT	-----
DrKin-1	MSSGGLLLLLGLLTLWAE	LTPI	SGH	DRPKFCYLPADP	GECLAHMRSFY	YDS	ESKKCKE	FIYGGCHGNANNF	TRDKCRQTCGASAKGRPT	-----
BBPTI-6	MSSGGLLLLLGLLTLWAE	LTPI	SGH	DRPKFCYLPADP	GECLAHMRSFY	YDS	ESKKCKE	FIYGGCHGNANNF	TRDKCRQTCGASAKGRPT	-----
RVV-II	-----	HDRETFCNLAPES	SGRC	RGHLRRIYYN	LES	SNKCKVEFYGGCGGN	NNF	ETRDECRQTCGGK	-----	-----
DrKin-7	MSSGGLLLLLGLLTLWAE	LTPI	SGH	DRPKFCYLPADP	GECLAHMRSFY	YDS	ESKKCKE	FIYGGCHGNANNF	TRDKCRQTCGASAKGRPT	-----

Сигнальный пептид

*****P1*****

Сигнальный пептид

P1

cVamChi (P00992), cVamTi (P00991), VamChi-1 (A0A1S5QJJ1), VamChi-2 (A0A1S5QJK2), VamChi-3 (A0A1S5QJJ1), VamChi-5 (A0A1S5QK73), VamChi-7 (A0A1S5QKN1), VamTi-4 (A0A1S5QK15) из *V. ammodytes*; RVV-II (P00990), DrKin (H9BFA3), DrKin-I (H6VC05), DrKin-II (H6VC06), DrKin-1 (Q2ES50), DrKin-2 (Q2ES49), DrKin-3 (Q2ES48), DrKin-4 (Q2ES47), DrKin-5 (Q2ES46), DrKin-6 (H9CCK3), DrKin-7 (H9CCK2), DrKin-8 (H9CCK4) из *D. russelii russelii*; BBPTI-1 (A8Y7P1), BBPTI-2 (A8Y7P2), BBPTI-3 (A8Y7P3), BBPTI-4 (A8Y7P4), BBPTI-5 (A8Y7P5), BBPTI-6 (A8Y7P6), CBPTI-1 (A8Y7N4), CBPTI-2 (A8Y7N5), CBPTI-3 (A8Y7N6), CBPTI-4 (A8Y7N7), CBPTI-5 (A8Y7N8), CBPTI-6 (A8Y7N9), BPTI-7 (A8Y7P0), DsKin (H7BRM8) из *D. russelii siamensis*. P1 – остаток реактивного сайта взаимодействия пептида с протеазой. Стрелкой показана позиция отщепления сигнального пептида от зрелого пептида. Идентичные и консервативные остатки показаны темно- и светло-серым цветом соответственно

Рисунок 4 – Выравнивание последовательностей предшественников ингибиторов протеаз Кунитц-типа змей семейства Viperidae

Более широкое разнообразие мультигенных семейств пептидов Кунитц-типа найдено у змей семейства Elapidae. В литературе описаны мультигенные семейства, обнаруженные у *Pseudonaja textilis textilis* [102,105], *Pseudechis australis*, *Notechis scutatus scutatus*, *Oxyuranus microlepidotus* и *Oxyuranus scutellatus* [102], *B. multicinctus* [101], *Drysdalia coronoides* [106], *Pseudechis rosignolii* [107]. Кроме того, в базе данных Uniprot обнаружены транскрипты, кодирующие изоформы пептидов Кунитц-типа из *Parasuta nigriceps* (PnSPI-1-12), *Furina ornata* (KP-Fur 8, 10, 17, 18), *Cacophis squamulosus* (KP-Cac-7, 10, 14, 20), *Pseudechis porphyriacus* (блакелин-1-3), *Russatus nigrescens* (нигресценины-1–6). Ниже будут рассмотрены только наиболее изученные мультигенные семейства пептидов Кунитц-типа змей.

В транскриптом *P. textilis textilis* обнаружены последовательности, кодирующие шесть изоформ текстилининов, Txln 1-6, две из которых были идентичны ингибиторам плазмينا (Txln 1, Txln 2), выделенным ранее из яда этой змеи [96]. Различия в выведенных аминокислотных последовательностях (АП) текстилининов наблюдались по 39 позициям, в основном, на N-концевом участке и в области протеаза-связывающей петли. Анализ остатков для Txln 3-6, консервативных у Txln 1 и 2, показал 13 различий с Txln 3, 15 – с Txln 4 и по 16 – с Txln 5 и 6. Из них семь замен были общими для Txln 3-6 и располагались в области протеаза-связывающей петли (рисунок 5). Множественные аминокислотные замены привели к снижению ингибирующей активности Txln 3-6 в отношении плазмينا [105].

		↓1		20		40		59																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
Mulgin 1	MSSGG	L	F	L	L	G	L	L	T	L	W	E	V	L	T	P	V	S	S	K	D	R	P	K	F	C	E	L	P	D	S	G	S	K	G	S	F	Q	A	F	Y	H	P	V	H	R	T	C	L	E	F	I	Y	G	G	C	E	G	N	D	N	N	F	K	T	I	D	E	C	K	R	T	C	A	A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
Pr-mulgin 2	MSSGG	L	F	L	L	G	L	L	T	L	W	E	V	L	T	P	V	S	S	K	D	R	P	K	F	C	E	L	P	A	D	S	G	S	K	G	N	F	Q	A	F	Y	H	P	V	H	R	T	C	L	E	F	I	Y	G	G	C	E	G	N	D	N	N	F	K	T	I	D	E	C	K	R	T	C	A	T																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
Mulgin 3	MSSGG	L	L	L	L	L	G	L	L	T	L	W	E	G	L	T	P	V	S	S	K	D	R	P	N	F	C	H	L	P	H	D	P	G	P	C	K	G	N	F	Q	A	F	Y	H	P	V	R	T	C	L	E	F	I	Y	G	G	C	Q	G	N	P	N	N	F	K	T	I	D	E	C	K	R	T	C	A	A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
Pr-mulgin 3	MSSGG	L	L	L	L	L	G	L	L	T	L	W	E	G	L	T	P	V	S	S	K	D	R	P	H	F	C	H	L	P	H	D	P	G	P	C	K	G	N	F	Q	A	F	Y	H	P	V	R	T	C	L	E	F	I	Y	G	G	C	Q	G	N	P	N	N	F	K	T	I	D	E	C	K	R	T	C	A	A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
Mulgin 4	MSSGG	L	L	L	L	L	G	L	L	T	L	W	E	G	L	T	P	V	S	S	K	D	H	P	R	F	C	E	L	P	A	D	P	G	P	C	N	G	L	F	Q	A	F	Y	N	P	V	Q	R	T	C	L	K	F	R	Y	G	G	C	K	G	N	P	N	T	F	K	T	I	E	E	C	K	R	T	C	A	A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
Mulgin 5	MSSGG	L	L	L	L	L	G	L	L	T	L	W	E	V	L	T	P	V	S	S	K	D	R	P	R	F	C	E	L	P	A	D	P	G	P	C	N	G	L	F	Q	A	F	Y	N	P	V	Q	R	T	C	L	K	F	R	Y	G	G	C	K	G	N	P	N	T	F	K	T	I	E	E	C	K	R	T	C	A	A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
Pr-mulgin 1	MSSGG	L	L	L	L	L	G	L	L	T	L	W	E	V	L	T	P	V	S	S	K	D	R	P	R	F	C	E	L	P	A	D	P	G	P	C	N	G	L	F	Q	A	F	Y	N	P	V	Q	R	T	C	L	K	F	R	Y	G	G	C	K	G	N	P	N	T	F	K	T	I	E	E	C	K	R	T	C	A	A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
PILP-1	MSSGG	L	L	L	L	L	G	L	L	T	L	W	A	E	L	T	P	I	S	T	K	D	R	P	-	S	C	D	K	A	P	T	E	R	C	K	R	N	V	A	F	Y	N	P	S	A	R	D	C	L	Q	F	Y	G	G	C	D	G	N	K	H	F	R	S	K	A	L	C	L	F	H	C	H	R																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
PILP-2	MSSGG	L	L	L	L	L	G	L	L	T	L	W	E	L	T	P	V	S	S	K	N	R	P	F	C	N	L	L	P	E	P	G	R	C	N	A	I	V	R	A	F	Y	N	S	R	P	R	K	C	L	E	F	P	Y	G	G	C	G	N	A	N	N	F	K	T	I	E	E	C	O	R	T	C	A	G																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
PILP-3	MSSGG	L	L	L	L	L	G	L	L	T	L	W	A	E	L	T	P	V	S	S	R	K	R	H	Q	F	C	N	V	P	E	P	G	R	C	N	A	N	V	R	A	F	Y	N	P	R	L	R	K	C	I	E	F	S	Y	G	G	C	G	N	A	N	N	F	K	S	R	G	E	C	K	R	T	C	A	E																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
Mulgin 2	MSSGG	L	L	L	L	L	G	L	L	T	L	W	E	L	T	P	V	S	S	K	D	R	P	F	C	E	L	P	A	I	T	G	P	C	R	V	G	F	P	S	F	Y	N	P	D	E	K	K	C	L	E	F	I	Y	G	G	C	Q	G	N	A	N	N	F	I	T	K	E	E	C	E	S	T	C	A	A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
Txln 1	MSSGG	L	L	L	L	L	G	L	L	T	L	W	E	V	L	T	P	V	S	S	K	D	R	P	D	F	C	E	L	P	A	I	T	G	P	C	R	V	R	F	P	S	F	Y	N	P	D	E	K	K	C	L	E	F	I	Y	G	G	C	E	G	N	A	N	N	F	I	T	K	E	E	C	E	S	T	C	A	A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
Txln 2	MSSGG	L	L	L	L	L	G	L	L	T	L	W	E	V	L	T	P	V	S	S	K	D	R	P	E	L	C	E	L	P	T	G	P	C	R	V	R	F	P	S	F	Y	N	P	D	E	Q	K	C	L	E	F	I	Y	G	G	C	E	G	N	A	N	N	F	I	T	K	E	E	C	E	S	T	C	A	A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
Txln 5	MSSGG	L	L	L	L	L	G	L	L	T	L	W	E	V	L	T	P	V	S	S	K	D	R	P	K	F	C	E	L	L	P	D	T	G	S	C	E	D	F	T	G	A	F	H	Y	S	T	R	D	R	E	C	I	E	F	I	Y	G	G	C	G	N	A	N	N	F	I	T	K	E	E	C	E	S	T	C	A	A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
Txln 7	MSSGG	L	L	L	L	L	G	L	L	T	L	W	E	V	L	T	P	V	S	S	K	D	R	P	K	F	C	E	L	L	P	D	T	G	S	C	E	D	F	T	G	A	F	H	Y	S	T	R	D	R	E	C	I	E	F	I	Y	G	G	C	G	N	A	N	N	F	K	T	E	E	C	E	S	T	C	A	A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
Txln 6	MSSGG	L	L	L	L	L	G	L	L	T	L	W	E	V	L	T	P	V	S	S	K	D	R	P	K	F	C	E	L	P	A	I	T	G	P	C	D	F	T	G	A	F	H	Y	S	P	R	E	H	E	C	I	E	F	I	Y	G	G	C	K	N	A	N	N	F	T	Q	E	E	C	E	S	T	C	A	A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
Txln 3	MSSGG	L	L	L	L	L	G	L	L	T	L	W	E	V	L	T	P	V	S	S	K	D	R	P	N	F	C	K	L	P	A	E	T	G	R	C	N	A	K	I	P	R	F	Y	N	P	R	Q	H	C	I	E	F	L	Y	G	G	C	G	N	A	N	N	F	K	T	I	K	E	C	E	S	T	C	A	A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
Txln 4	MSSGG	L	L	L	L	L	G	L	L	T	L	W	E	V	L	T	P	V	S	S	K	D	H	P	K	F	C	E	L	P	A	I	T	G	S	C	K	G	N	V	P	R	F	Y	N	A	D	H	Q	C	L	F	I	Y	G	G	C	E	G	N	A	N	N	F	K	T	I	E	E	C	K	S	T	C	A	A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
	Сигнальный пептид																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											

Mulgin 1 (Q6ITC1), Mulgin 2 (Q6ITC0), Mulgin 3 (Q6ITB9), Mulgin 4 (Q6ITB8), Mulgin 5 (B5L5Q8) из *Pseudechis australis*; Pr-mulgin 1 (E7FL11), Pr-mulgin 2 (E7FL12), Pr-mulgin 3 (E7FL13) из *Pseudechis rossignolii*; PILP-1 (B4ESA2), PILP-2 (B4ESA3), PILP-3 (B4ESA4) из *B. multicinctus*; Txln 1 (Q90WA1), Txln 2 (Q90WA0), Txln 3 (Q90W99), Txln 4 (Q90W98), Txln 5 (Q90W97), Txln 6 (Q90W96), Txln 7 (B5L5Q1) из *P. textilis textilis*. P1 – остаток реактивного сайта взаимодействий пептида с протеазой. Стрелкой показана позиция отщепления сигнального пептида от зрелого пептида. Идентичные и консервативные остатки показаны темно- и светло-серым цветом соответственно

Рисунок 5 – Выравнивание последовательностей предшественников ингибиторов протеаз Кунитц-типа змей семейства Elapidae

В транскриптомах двух близкородственных змей: *P. australis* и *P. rossignolii*, обитающих в Австралии и Новой Гвинее, соответственно, обнаружено мультигенное семейство пептидов Кунитц-типа, названных малгинами [102]. Интересно, что в библиотеке кДНК *P. rossignolii* кроме обнаруженных малгинов другие пептиды Кунитц-типа не были найдены, что может быть связано с низким уровнем их экспрессии. Высокая степень идентичности сигнальных последовательностей малгинов указывает на принадлежность кодирующих их генов к одному семейству. Идентичность между последовательностями зрелых пептидов составляет 92–99%. Различия между ними наблюдались по 27 позициям аминокислотных остатков, причем малгины из *P. australis* содержат большее количество точечных замен, чем их ортологи [107].

Мультигенное семейство ингибиторов протеаз Кунитц-типа из *B. multicinctus* включает на сегодняшний день три представителя – PILP 1-3 [101]. Согласно литературным данным, гены ингибиторов PILP 1-3, вместе с генами, кодирующими В-цепи β -бунгаротоксинов, утративших ингибиторную функцию, и ген ингибитора α -химотрипсина NACI из *Naja naja atra* имеют общую экзон-интронную организацию. Высокая степень идентичности последовательностей генов указывает на их происхождение от одного анцестрального предка. Филогенетический анализ представителей этих групп показал разделение транскриптов на две клады: PILP 2 и PILP 3 располагаются вместе с NACI, B5- и B6-цепями бунгаротоксинов, тогда как PILP 1 вместе с остальными В-цепями бунгаротоксинов формирует другую кладу, несмотря на то, что ответвление PILP 1 от В-цепей произошло намного раньше (рисунок 6) [101]. Предыдущие исследования показали, что действие ускоренной эволюции на области экзонов фосфолипаз A2, нейротоксинов и кардиотоксинов змей привело к функциональному разнообразию этих белков [108–110]. На основании данных результатов было высказано предположение, что ускоренная эволюция может быть ключевым событием в процессе формирования мультигенных семейств пептидов Кунитц-типа змей [101].

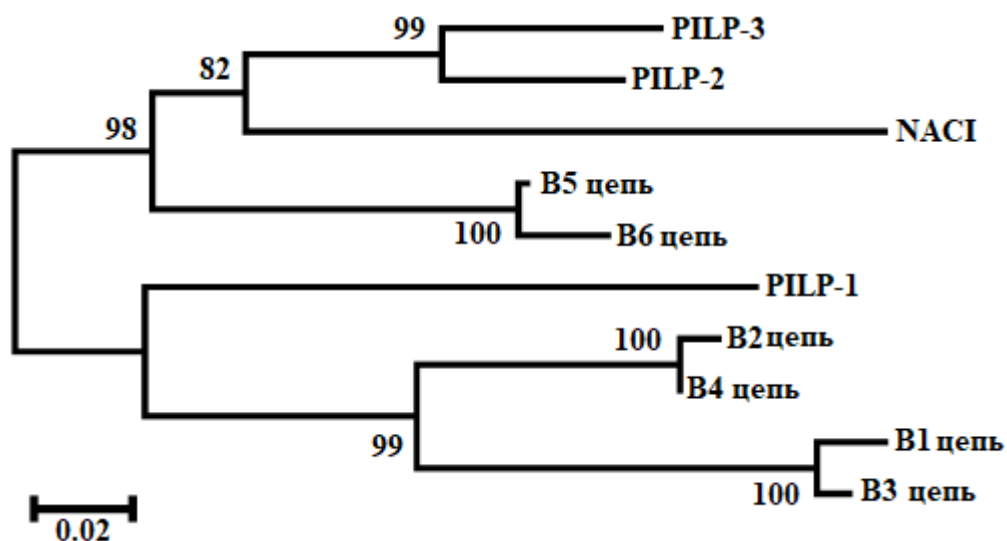


Рисунок 6 – Филогенетическое дерево генов, кодирующих ингибиторы PILP, В-цепи β -бунгаротоксинов и ингибитор α -химотрипсина NACI [101]

Другая группа пептидов Кунитц-типа включает токсины, у которых сохраняется пространственная организация и расположение остатков Cys, характерные для Кунитц-фолда, но происходит частичная или полная потеря ингибиторной активности в отношении протеаз. К таким токсинам Кунитц-типа, помимо В-цепей β -бунгаротоксинов из *B. multicinctus*, также относятся дендротоксины из змей рода *Dendroaspis*.

Дендротоксины являются ярким примером действия конвергентной эволюции и неофункционализации. Мультигенное семейство дендротоксинов включает ряд ортологических генов из *D. angusticeps* (DTX- α , - β , - γ , - ϵ , - δ) [111,112], *Dendroaspis viridis* (Dv14) [113] и *D. polylepis* (DTX-A, -B, -E, -I и -K) [114–116]. Последовательности зрелых дендротоксинов состоят из 57–60 а.о., включая шесть консервативных остатков Cys. Степень идентичности между ними составляет 49–98% (рисунок 7). Несмотря на высокую идентичность АП и сходство пространственных структур с классическими пептидами Кунитц-типа, дендротоксины практически утратили возможность ингибировать протеазы, но приобрели способность блокировать активность K_v каналов [34,112]. Вследствие накопления мутаций в сайтах, обеспечивающих взаимодействие с ионными каналами, наблюдается смещение консервативных участков в последовательности пептида. Так, анализ АП ингибиторов протеаз Кунитц-типа змей показал, что наибольшее число замен локализовано в основном на N- и C-концах пептидов и в области протеаза-связывающей петли. Все эти регионы участвуют во взаимодействии с протеазами и определяют специфичность пептидов Кунитц-типа. В случае дендротоксинов проявление нейротоксической активности связывают с вариабельностью остатков на N-конце молекулы, тогда как C-концевые аминокислотные остатки остаются консервативными [111,117].

	↓1	20	40	61
BcTx-B1	MSSGGLLLLGLLTLCAELTPVSSRQRHRDCDKPPDKGNC	GSVRRAFYYDTRLKTC	KAFPYRGCGNGNHFKTETL	CRCECLVYP
BcTx-B4	-SSGGLLLLGLLTLCAELIPVSSRQRHRDCDKPPDKGNC	GSVRRAFYYDTRLKTC	KAFPYRGCGNGNHFKTETL	CRCECLVYP
BTx-B1	MSSGGLLLLGLLTLCAELIPVSSRQRHRDCDKPPDKGNC	GPVRRAFYYDTRLKTC	KAFQYRGCGNGNHFKTETL	CRCECLVYP
BTx-B3	MSSGGLLLLGLLTLCAELIPVSSRQRHRDCDKPPDKGNC	GPVRRAFYYDTRLKTC	KAFQYRGCGNGNHFKSDHLC	CRCECLEYS
BTx-B5	MSSGGLLLLGLLTLCAELTPVSSRKRHPYCNLPDPG	CHDNKFAYHHPASNKCKEFVYGGCGGNDNR	FKTRNKQ	CQCTCSG--
DaE1	-----	LQHRTFCKLPAEPGPKASIPAFYYNWA	AKKQCLFHYGGCKGNANRFSTIEK	CRACVG--
DTX- ϵ 1	-----	LQHRTFCKLPAEPGPKASIPAFYYNWA	AKKQCLFHYGGCKGNANRFSTIEK	CRACVG--
DTX-E	-----	LQHRTFCKLPAEPGPKASIPAFYYNWA	AKKQCLFHYGGCKGNANRFSTIEK	CRHACVG--
DTX- ϵ 2	-----	LQHRTFCKLPAEPGPKASIPAFYYNWA	AKKQCLFHYGGCKGNANRFSTIEK	CRHACVG--
DTX- α	-----	QPRRLCILHRNPGRGYDKIPAFYYNQKKQ	CEFDWSGCGGNSNRFTIEEC	CRRTCIG--
DTX-I	-----	QPLRLCILHRNPGRGYDKIPAFYYNQKKQ	CEFTWSGCGGNSNRFTIEEC	CRRTCIRK--
DTX- δ	-----	AAKYCKLPLRIGPCKRKIPSFYKWKAKQ	CLPFDYSGCGGNSNRFTIEEC	CRRTCVG--
DTX-K	-----	AAKYCKLPLRIGPCKRKIPSFYKWKAKQ	CLPFDYSGCGGNSNRFTIEEC	CRRTCVG--
DTX-B	-----	RPYACELIVAAGFCMFFISAFYYSKGANK	CYPFTYSGCRGNANRFSTIEEC	CRRTCVV--
BcTx-B2b	MSSGGLLLLGLLTLWAEITPVSSRKRHPDCDKPPDTRIC	QTVVRAFYKPKSEKRCVQFRYGGCKGNNGHFKSDHLC	CRCECLEYR	
BcTx-B3	MSSGGLLLLGLLTLWAEITPVSSRKRHPDCDKPPDTRIC	QTVVRAFYKPKSEKRCVQFRYGGCKGNNGHFKSDHLC	CRCECLEYR	
BcTx-B2a	MSSGGLLLLGLLTLWAEITPVSSRKRHPDCDKPPDTRIC	QTVVRAFYKPKSAKRCVQFRYGGCGNGNHFKSDHLC	CRCECLEYP	
BcTx-B2a	MSSGGLLLLGLLTLCAELTPVSSRKRHPDCDKPPDTRIC	QTVVRAFYKPKSAKRCVQFRYGGCGNGNHFKSDHLC	CRCECLEYR	
BTx-B4	MSSGGLLLLGLLTLCAELTPVSSRKRHPDCDKPPDTRIC	QTVVRAFYKPKSAKRCVQFRYGGCGNGNHFKSDHLC	CRCECLEYS	
Сигнальный пептид				
***** P1 *****				

BTx-B1 (P00987), BTx-B2 (P00989), BTx-B3 (Q9W728), BTx-B4 (Q1RPT0), BTx-B5 (Q1RPS9) из *B. multicinctus*; BcTx-B1 (Q8AY46), BcTx-B2a (Q8AY45), BcTx-B2b (Q8AY44), BcTx-B3 (Q75S50), BcTx-B4 (Q75S49) из *Bungarus candidus*; DTX- α (P00980), DTX- δ (P00982), DTX- ϵ 1 (Q7LZS8), DTX- ϵ 2 (Q7LZE3) и DaE1 (P0DMJ6) из *D. angusticeps*; DTX-B (P00983), DTX-E (P00984), DTX-I (P00979) и DTX-K (P00981) из *D. polylepis*. * – остаток в P1-положении реактивного сайта взаимодействий пептида с протеазой. Стрелкой показана позиция отщепления сигнального пептида от зрелого пептида.

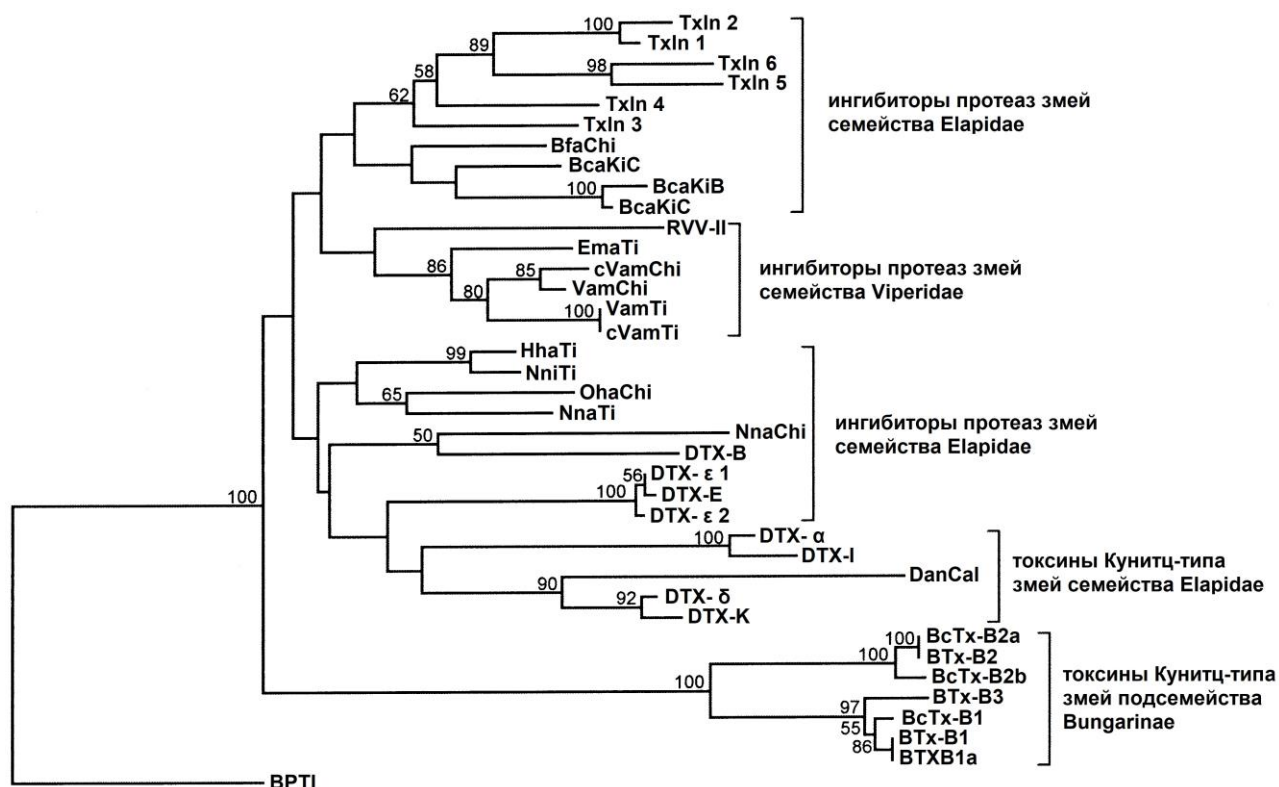
Идентичные и консервативные остатки показаны темно- и светло-серым цветом соответственно

Рисунок 7 – Выравнивание последовательностей предшественников токсинов Кунитц-типа змей семейства Elapidae

β -Бунгаротоксины являются нейротоксинами, состоящими из двух цепей, А (около 14 кДа) и В (около 7 кДа), соединенных межцепочечной дисульфидной связью [15,118]. А-цепи структурно гомологичны фосфолипазам А₂, тогда как В-цепи демонстрируют высокое сходство с пептидами Кунитц-типа [15]. Случайные комбинации А- и В-цепей образуют порядка 16 изоформ β -бунгаротоксинов [119]. Исследования показали, что А- и В-цепи кодируются разными генами, которые произошли от двух отличных предковых генов [120].

Мультигенное семейство В-цепей включает шесть представителей (В1-В6) из *B. multicinctus* [121] и пять представителей (В1-В4) из *Bungarus candidus* [97]. Однако в настоящее время изучены только пептиды из *B. multicinctus*. Как упоминалось выше, гены В-цепей бунгаротоксинов и ингибиторов протеаз PILP и NACI произошли, вероятно, от одного анцестрального гена. При этом влияние ускоренной эволюции и положительного отбора привело к тому, что В-цепи бунгаротоксинов утратили возможность ингибировать протеазы разных классов и приобрели способность ингибировать К_v как нейротоксины. Сравнение последовательностей генов показало высокую степень идентичности экзонов (63–96%). Отмечается, что размеры первого интрона во всех генах В-цепей остаются примерно одинаковыми, тогда как последовательность второго интрона в генах В1- и В2-цепей оказалась почти в два раза длиннее остальных. При этом последовательности второго интрона сохраняют высокую консервативность (91-96%).

Филогенетический анализ дендротоксинов, В-цепей β -бунгаротоксинов и ингибиторов протеаз Кунитц-типа змей показал, что они разделяются на три кластера в соответствии с выполняемой функцией [97]. Первый кластер включал представителей ингибиторов протеаз змей семейства Viperidae и Elapidae, второй кластер включал дендротоксины и некоторые ингибиторы протеаз змей семейства Elapidae, а в состав третьего кластера вошли В-цепи бунгаротоксинов (рисунок 8). Обособление В-цепей β -бунгаротоксинов от остальных пептидов Кунитц-типа змей, включая дендротоксины, вероятно, связано с функциональными ограничениями, поскольку В-цепи проявляют нейротоксическое действие только в составе гетеродимера с А-цепью (фосфолипаза А₂) [97].



NnaTi (S13846), NnaChi (S12957) из *Naja naja*, EmaTi (S19327) из *Eristocophis macmahonii*, OhaChi (P82966) из *Ophiophagus hannah*, BfaChi (P25660) из *Bungarus fasciatus*, NniTi (P00986) из *Naja nivea*, HhaTi (P00985) из *Hemachatus haemachatus*, BcaKiA (AY057886), BcaKiB (AY057887), BcaKiC (AY057888) из *B. candidus*. В узлах показаны значения выше 50%

Рисунок 8 – Филогенетическое дерево пептидов Кунитц-типа змей, построенное методом ближайших соседей [73]

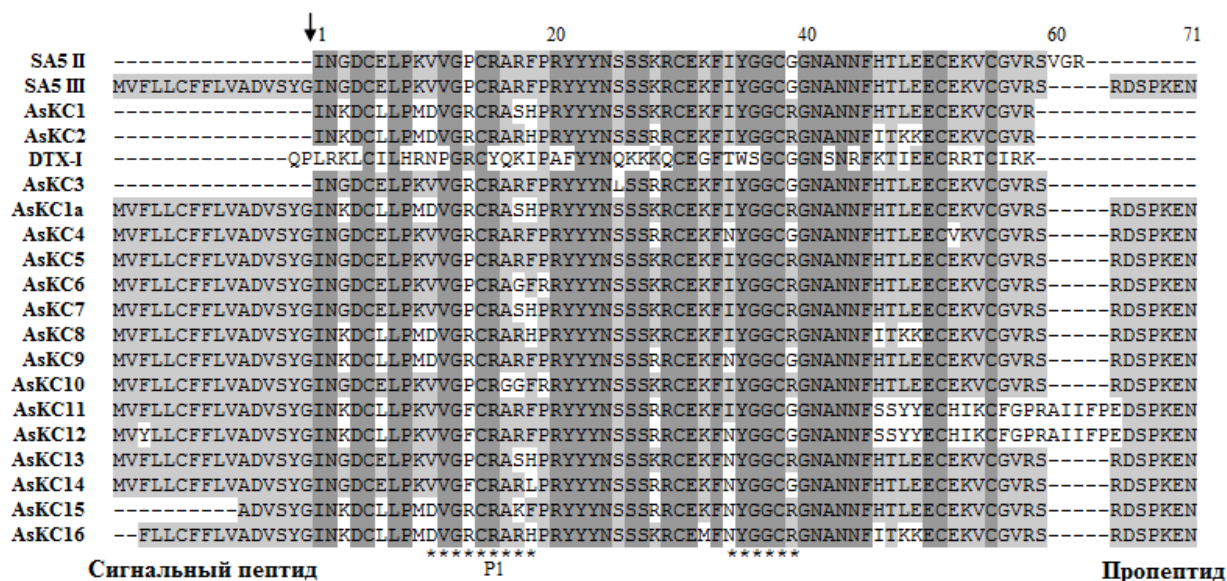
Таким образом, в геномах змей семейства Viperidae и Elapidae присутствуют многочисленные семейства генов, кодирующие высокогомологичные пептиды Кунитц-типа с широким спектром биологической активности. Наибольшее разнообразие наблюдается в транскриптомах змей семейства Elapidae, где обнаружены ингибиторы различных протеаз, включая протеазы каскада свертываемости крови, и блокаторы K_V .

1.2.2 Мультигенные семейства пептидов Кунитц-типа актиний

Ядовитый секрет актиний содержит комбинаторные библиотеки пептидов Кунитц-типа, которые кодируются мультигенными семействами. Такие семейства обнаружены в транскриптомах актиний сем. Actiniidae (*A. viridis* [52]), а также актиниях сем. Stichodactylidae, таких как *H. crispa* [46], *H. magnifica* [122], а также *S. haddoni* [55].

Показано, что мультигенное семейство пептидов Кунитц-типа *A. viridis* включает не менее 18 представителей [52]. Отличительной особенностью их предшественников является наличие пропептида (7 а.о.) на С-конце молекулы (рисунок 9). Все пептиды содержат шесть остатков Cys, топология расположения которых соответствует таковой BPTI. Степень

идентичности между пептидами составляет 69–99%. Последовательности зрелых SA5 II, AsKC11 и AsKC12 были более длинными по сравнению с остальными. Несмотря на высокое сходство N-концевого и центрального участков последовательностей AsKC11 и AsKC12 с таковыми других каликлудинов, С-концевые аминокислотные остатки (позиции 46–65) значительно отличаются (рисунок 9). Основные аминокислотные замены наблюдаются в сайте сильных взаимодействий каликлудинов с протеазами, при этом остаток Arg в Р1-положении остается консервативным во всех пептидах, что может указывать на наличие ингибирующей активности в отношении протеаз.



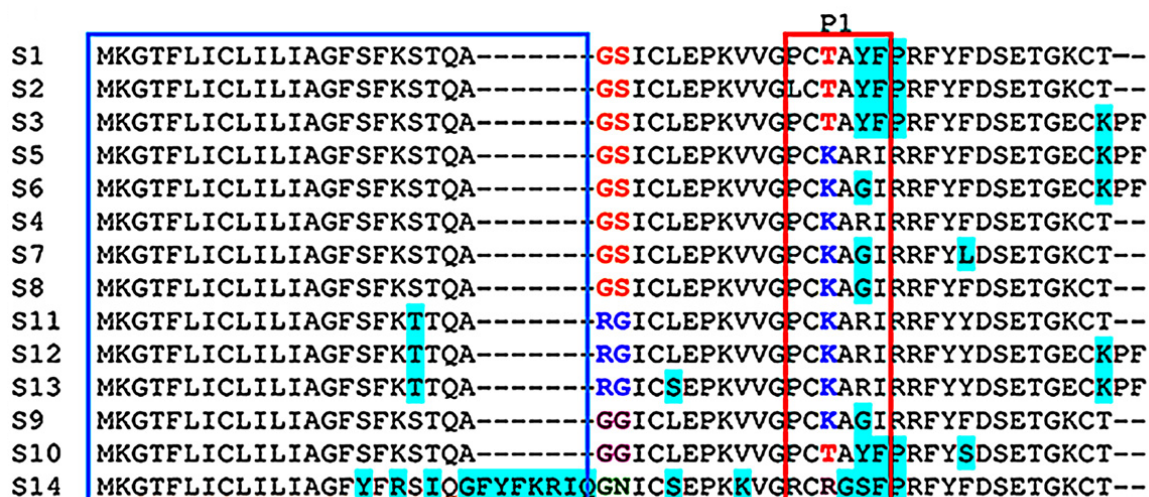
Р1-остаток реактивного сайта сильных взаимодействий с протеазой. Стрелкой показана позиция отщепления сигнального пептида от зрелого пептида. Идентичные и консервативные остатки показаны на темно- и светло-сером фоне соответственно

Рисунок 9 – Выравнивание последовательностей предшественников каликлудинов из актинии *A. viridis*

Большое семейство генов, кодирующих пептиды Кунитц-типа, было обнаружено в транскриптоме актинии *H. crispa* [46]. Оно включает четыре подсемейства, HCGS, HCRG, HCGG и HCGN, где HC – *H*eteractis *c*rispa, а GS-, GG-, RG- и GN- – первые два остатка зрелых пептидов. Кроме того, в транскриптоме *H. magnifica* обнаружено семь ортологичных последовательностей, кодирующих шесть HMGS-пептидов и HMRG1 пептид, причем некоторые из них оказались идентичны транскриптам *H. crispa* [122]. Интересно, что в транскриптоме *S. haddoni* также обнаружено пять транскриптов с сигнальными последовательностями, идентичными таковым подсемейства HCGS: три транскрипта кодируют пептиды Кунитц-типа с Gly-Gly (GG-) на N-конце, два транскрипта – с Arg-Gly (RG-) [55].

Высокая гомология пептидов Кунитц-типа *H. crispa*, *H. magnifica* и *S. haddoni* не удивительна, поскольку эти виды актиний принадлежат к одному семейству Stichodactylidae.

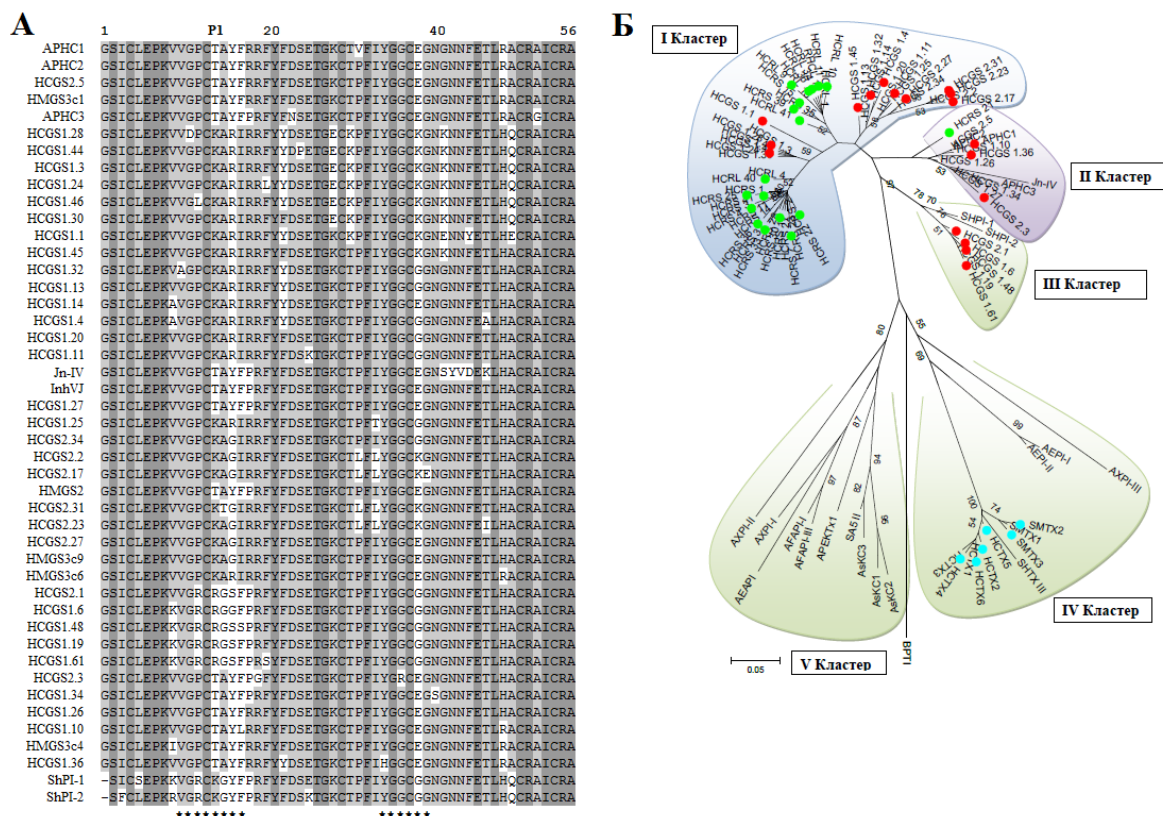
Предшественники GS-, RG- и GG-пептидов актиний включают сигнальный пептид (22 а.о.) и зрелый пептид (56 а.о.) (рисунок 10). Структура генов, установленная для HCGS-пептидов, включает два экзона, разделенные интроном, расположенным в области, кодирующей С-концевой сигнальный пептид. Интрон условно разделяет высоко- и менее консервативные участки нуклеотидной последовательности (НП), кодирующей сигнальный пептид. Несмотря на гипервариабельность последовательностей зрелых HCGS-пептидов, кодоны, кодирующие остатки Cys, имеют высокую консервативность и строгую инвариантность [46]. По-видимому, в генах HCGS-пептидов цистеиновые кодоны находятся под защитой от мутационного процесса.



Голубым квадратом выделены последовательности сигнального пептида, красным прямоугольником – сайт основных взаимодействий с протеазами. Вариабельные остатки показаны на голубом фоне. Синим, фиолетовым и красным шрифтом показаны первые аминокислотные остатки зрелого пептида и остаток в P1-положении реактивного сайта

Рисунок 10 – Выравнивание частичных последовательностей предшественников пептидов Кунитц-типа актинии *H. crispa*, полученные методом 5'-RACE [46]

Подсемейство GS-пептидов является наиболее изученным. Оно включает транскрипты, кодирующие 33 изоформы HCGS- и шесть HMGS- пептидов, отдельные представители которых оказались идентичны пептидам, выделенным ранее из экстракта *H. crispa* (рисунок 11, А) [29,30,49,50]. Так, HCGS2.5 и HMGS3c1 соответствуют APHC2 и HCGS1.27, а HMGS2 – InhVJ [46,122].



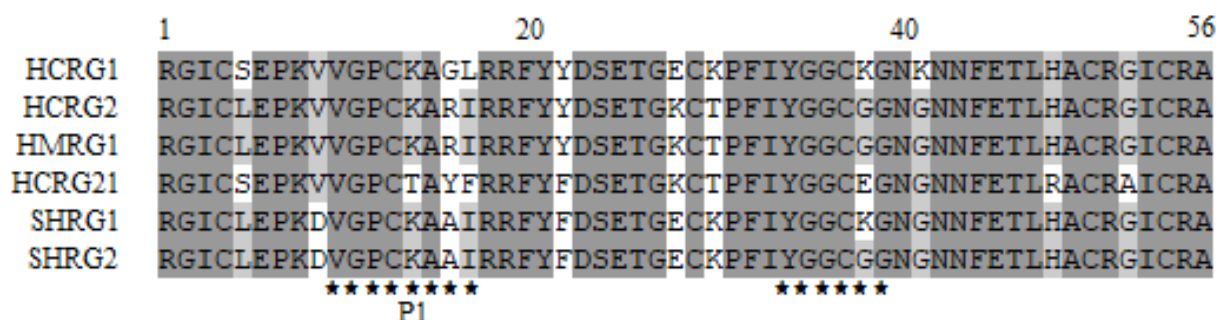
Звездочками (*) показаны сайты взаимодействия с протеазами. P1 – остаток реактивного сайта взаимодействия с протеазами. Идентичные и консервативные остатки показаны на темно- и светло-сером фоне. На филогенетическом древе HCGS-пептиды показаны красными, а HCRG – зелеными кругами. АП пептидов с Lys в P1 положении представлены на синем фоне, с Thr – на розовом фоне, с Arg – на зеленом фоне. Кластер IV объединяет токсины Кунитц-типа актиний *H. crispa* и *Stichodactyla mertensii*, а кластер V – ингибиторы протеаз Кунитц-типа актиний сем. Actiniidae

Рисунок 11 – Выравнивание аминокислотных последовательностей (А) и филогенетическое дерево (Б) GS-пептидов актиний *H. crispa* и *H. magnifica* [123]

Основные замены в зрелых пептидах наблюдаются в области обоих сайтов взаимодействия с протеазами (рисунок 11, А). В сайте слабых взаимодействий (позиции 33-38) наблюдаются замены остатка Gly38 на Glu или Lys, тогда как в сайте сильных взаимодействий (позиции 10–17) консервативными остаются только остатки Val10, Gly11 и Cys13. В соответствии с филогенетическими связями и природой остатка в P1-положении, HCGS-пептиды разделяются на три кластера: пептиды с остатком Lys, Arg или Thr в P1-положении (рисунок 11, Б). Кластер пептидов с Lys характеризуется широким диапазоном положительного заряда (+2,03 – +6,02), формируемым, преимущественно, остатками Lys14, Arg18 и Arg19. Кластер пептидов с Arg включает пять HCGS-пептидов, а также ShPI-1 и ShPI-2 из *S. helianthus*, у которых в P1-положении находится Lys. АП пептидов этого кластера показывают 86–96% идентичности, а заряд их молекул находится в узком диапазоне от +3,03 до +4,06 (за исключением ShPI-1, +6,02), определяемый остатками Lys9, Arg12 и Arg14. Кластер HCGS-пептидов с Thr включает десять пептидов, в том числе APHC1-APHC3 и InhVJ, которые

характеризуется слабым положительным зарядом (+1,81–+2,15), сформированным за счет остатков Arg18 и Arg48.

Еще одну группу пептидов Кунитц-типа составляют RG-пептиды, к которой относятся три представителя из *H. crisper* (HCRG1, HCRG2, HCRG21) [33,124], два из *S. haddoni* (SHRG1, SHRG2) [55] и один из *H. magnifica* (HMRG1) [122]. Степень идентичности последовательности между изоформами составляет 82-100%. Изоформа HMRG1 из *H. magnifica* оказалась идентичной HCRG2, тогда как изоформы SHRG были уникальны. Последовательности изоформ RG-пептидов различаются по 12 позициям, три из которых находятся в сайте сильных взаимодействий (рисунок 12). Множественный полиморфизм остатков наблюдается в положении 16 и 17. Интересно, что остаток по P1-положению характеризуется высокой консервативностью: большинство RG-пептидов содержит в P1-положении Lys, за исключением HCRG21 с Thr в этом положении. В сайте слабых взаимодействий аминокислотный полиморфизм обнаружен в положении 38. Так, у HCRG2, HMRG1 и SHRG2 в этой позиции находится Gly, тогда как в HCRG1 и SHRG1 – Lys, а в HCRG21 – Glu (рисунок 12).

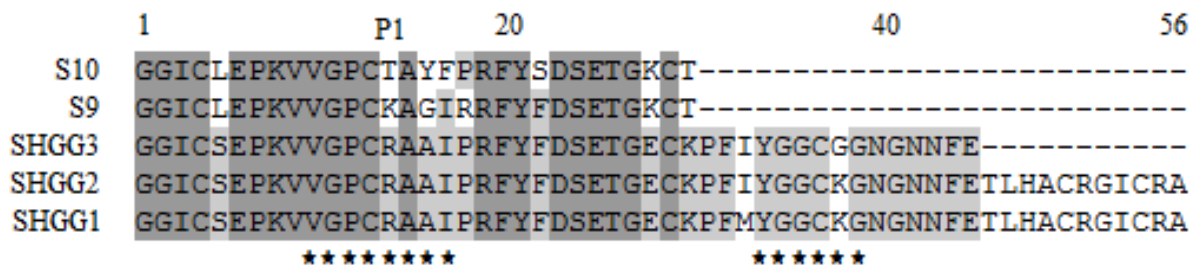


HCRG1, HCRG2, HCRG21 из *H. crisper*; HMRG1 из *H. magnifica*; SHRG1 и SHRG2 из *S. haddoni*. P1 – остаток реактивного сайта взаимодействия с протеазами. Звездочками показаны сайты сильных и слабых взаимодействий с протеазами. Идентичные и консервативные остатки показаны на темно- и светло-сером фоне соответственно

Рисунок 12 – Выравнивание последовательностей зрелых RG-пептидов актиний

Подсемейство HCGG-пептидов практически не изучено. В настоящее время установлена одна последовательность сигнального пептида, идентичная таковой HCGS-пептидов, и две N-концевые последовательности зрелого пептида. Благодаря транскриптомному подходу, удалось обнаружить три полноразмерные последовательности зрелых GG-пептидов у актинии *S. haddoni* (рисунок 13) [55]. Отличия между SHGG-пептидами наблюдаются в области сайта слабых взаимодействий с протеазами по двум позициям. В свою очередь вариабельные остатки в S9 и S10 пептидах актиний *H. crisper* располагаются в сайте сильных взаимодействий [46]. У SHGG-пептидов в P1-положении находится остаток Arg, тогда как в S9 – Lys, а в S10 – Thr,

характерные для GS-пептидов. Подобно RG-пептидам в пятой позиции у GG-пептидов *H. crispata* располагается Leu, а в SHGG – Ser.



Звездочками показаны сайты сильных и слабых взаимодействий с протеазами. P1 – остаток реактивного сайта. Идентичные и консервативные аминокислотные остатки показаны на темно- и светло-сером фоне соответственно

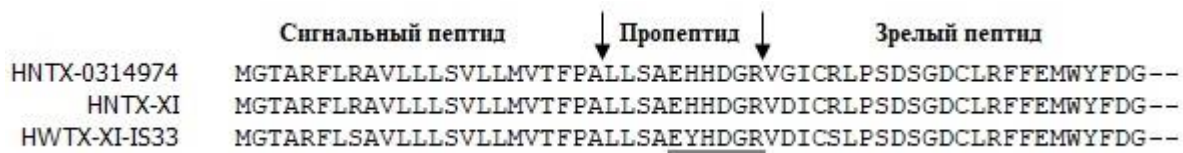
Рисунок 13 – Выравнивание последовательностей GG-пептидов *H. crispata* (S9, S10) и *S. haddoni* (SHGG1-SHGG3)

Таким образом, мультигенные семейства пептидов Кунитц-типа актиний характеризуются многочисленностью их представителей и большим разнообразием изоформ. Присутствие представителей подсемейств пептидов Кунитц-типа в транскриптомах актиний семейства Stichodactylidae указывает на дивергенцию их генов до формирования родов.

1.2.3 Мультигенные семейства пептидов Кунитц-типа других групп животных (паукообразные, земноводные, моллюски)

1.2.3.1 Мультигенные семейства пептидов Кунитц-типа пауков

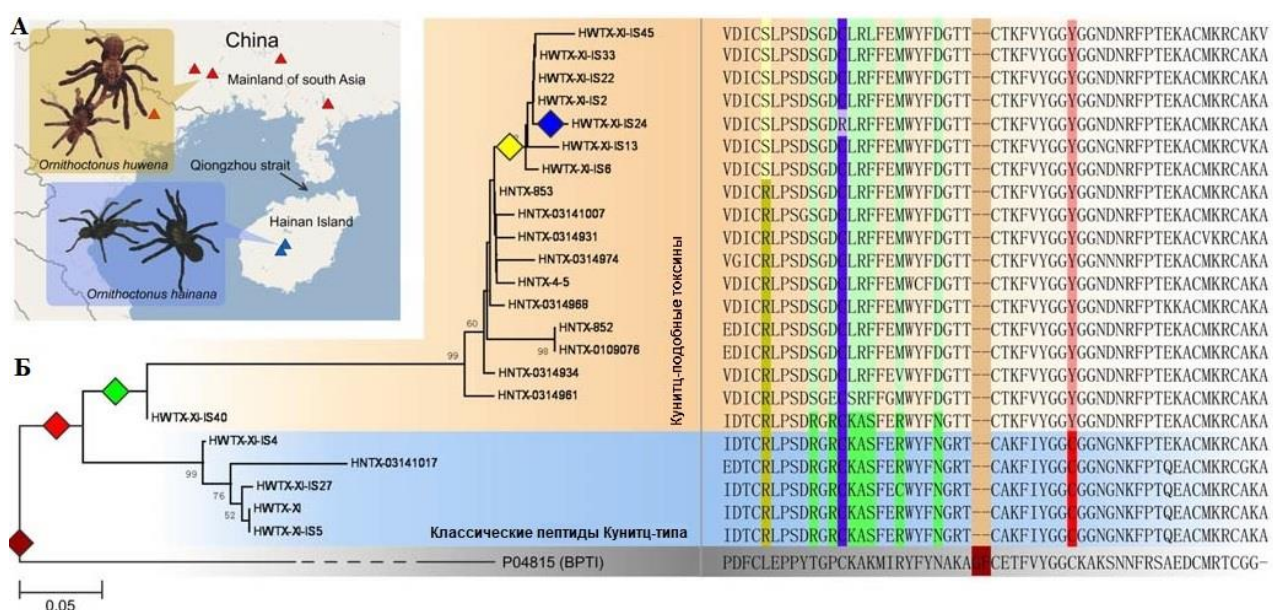
Мультигенные семейства пептидов Кунитц-типа также были обнаружены в пауках рода *Ornithoctonus* и крестовика *Araneus ventricosus*. При анализе транскриптомов *O. huwena* и *Ornithoctonus hainana* было обнаружено 45 представителей HWTX-XI-подобных пептидов Кунитц-типа: 34 последовательности найдено среди транскриптов *O. huwena* (HWTX-XI) и 11 – *O. hainana* (HNTX). Интересно, что гены, кодирующие эти пептиды, не содержат интронов. Предполагается, что интроны трансформировались в экзоны вследствие альтернативного сплайсинга в процессе адаптации к окружающей среде [125]. Предшественники HWTX-XI-подобных пептидов Кунитц-типа отличаются от таковых змей наличием пропептида (10 а.о.) между сигнальным и зрелым пептидами. Анализ последовательностей пропептида показал наличие на С-конце пептида отрицательно заряженных остатков (Glu или Asp) и положительно заряженного остатка Arg, разделенных четырьмя аминокислотными остатками (рисунок 14). Подобные сайты распознаются процессинговыми конвертазами, отвечающими за созревание токсинов пауков [126], а отщепление пропептида от зрелого пептида происходит по остатку Arg, согласно правилу «EtoR» [127].



Стрелками показаны позиции отщепления сигнального пептида и пропептида от зрелого пептида.
Темно-серой полосой показан сайт узнавания конвертазой

Рисунок 14 – Выравнивание предшественников пептидов Кунитц-типа *O. huwena* и *O. hainana*

Сравнение последовательностей зрелых пептидов показало различие между ними по 9 позициям, включая Cys34. Основные замены локализируются в области протеаза-связывающей петли (рисунок 15, Б). По количеству высококонсервативных остатков Cys эти пептиды могут быть разделены на две группы: классические пептиды Кунитц-типа с шестью остатками Cys и Кунитц-подобные токсины, у которых присутствует замена Cys34Тур (замена кодона TGC на TAC) [27].



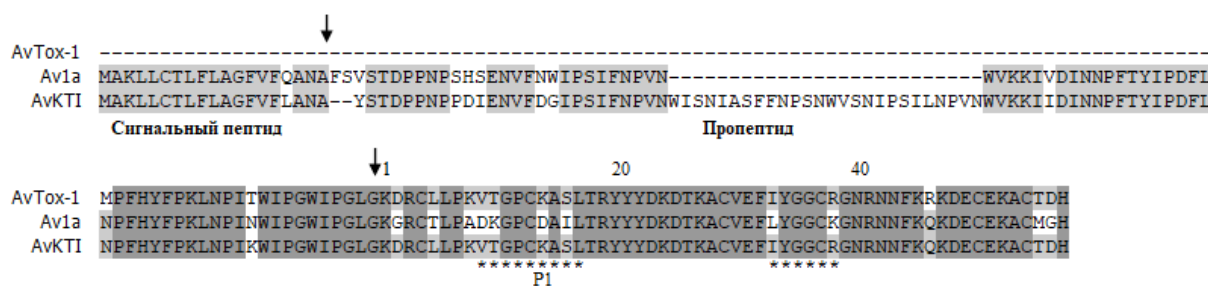
А – Ареалы обитания *O. huwena* и *O. hainana*. Красными и синими треугольниками показаны регионы, в которых были обнаружены пауки. Б – Филогенетическое дерево, построенное методом минимальной эволюции, и выравнивание АП пептидов Кунитц-типа *O. huwena* и *O. hainana*. Кунитц-подобные пептиды и классические представители семейства выделены оранжевым и светло-голубым цветом соответственно

Рисунок 15 – Выравнивание АП и эволюция пептидов Кунитц-типа *O. huwena* и *O. hainana* [27]

На основании данных филогенетического анализа и высокой консервативности сигнального пептида был сделан вывод о том, что HWTX-XI-подобные пептиды произошли от общего предка. Более того, на основании экологических и эволюционных данных, виды *O.*

huwena и *O. hainana*, занимающие разные ареалы обитания (рисунок 15, А), произошли от общего предка, который разделился во время образования проливов Цюн Чжоу [128,129].

Другое мультигенное семейство пептидов Кунитц-типа было обнаружено в геноме крестовика *Araneus ventricosus*. Представителем этого семейства является AvKTI (K7YYJ2) [67]. Показано, что AvKTI экспрессируется только в клетках эпидермиса. Отличительной особенностью предшественника AvKTI является длинный пропептид (94 а.о.) (рисунок 16). В базе данных UniProt было найдено еще два AvKTI-подобных пептида, AvTox-1 (Q8T3S7) и Av1a (A0A4Y2AEB9). Оба пептида (AvKTI и Av1a) объединяет высокая идентичность последовательностей сигнального пептида, однако пропептид Av1a короче такового AvKTI на 25 а.о. (рисунок 16). Сигнальная последовательность AvTox-1 не установлена, но С-конец пропептида высокоомологичен таковому AvKTI.



P1-остаток реактивного сайта взаимодействий с протеазой. Стрелками показаны позиции отщепления сигнального пептида и пропептида от зрелого пептида. Идентичные и консервативные остатки показаны темно- и светло-серым цветом соответственно

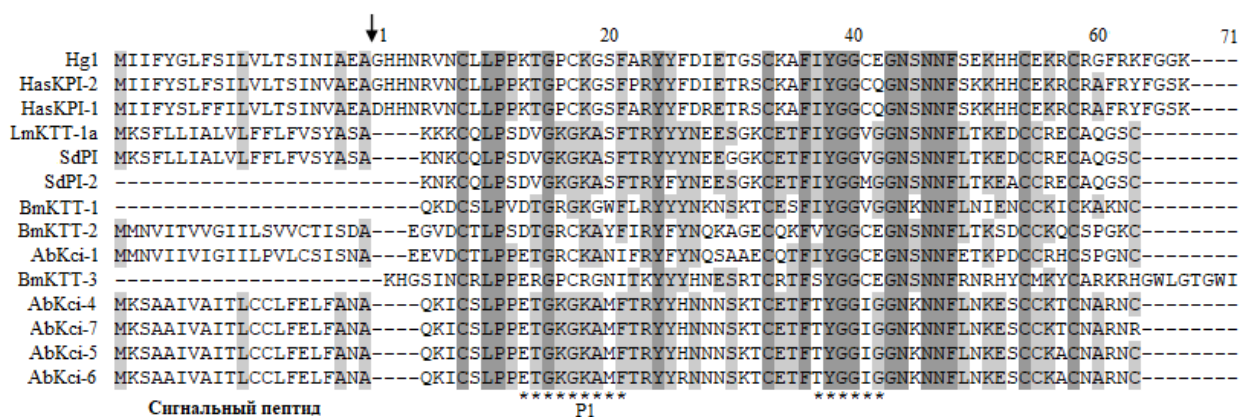
Рисунок 16 – Выравнивание последовательностей предшественников пептидов Кунитц-типа паука *A. ventricosus*

Идентичность последовательностей зрелых пептидов составляет 82–96%. Все пептиды содержат шесть консервативно расположенных остатков Cys, характерных для пептидов Кунитц-типа. AvTox-1 и AvKTI отличаются друг от друга только заменой Gln46Arg, тогда как различия между Av1a и AvKTI наблюдаются по 12 позициям а.о. (рисунок 16). Уникальной особенностью пептида AvKTI является наличие сайтов гликозилирования [67]. Исследование ингибирующей активности AvKTI показало, что он ингибирует трипсин, химотрипсин, плазмин, а также эластазу [67], что может объясняться присутствием Lys в P1-положении (у Av1a – остаток Glu).

Таким образом, мультигенное семейство пептидов Кунитц-типа пауков рода *Ornithoctonus* является более разнообразным, чем таковое крестовика *A. ventricosus*. Отличительной особенностью генов, кодирующих пептиды Кунитц-типа пауков, является отсутствие интронов и появление последовательности, кодирующей пропептид.

1.2.3.2 Мультигенные семейства пептидов Кунитц-типа скорпионов

Содержание пептидов Кунитц-типа в ядах скорпионов невелико. Так, в транскриптоме скорпиона *H. gertschi* был обнаружен сильный блокатор $K_v1.3$ канала, названный Hg1 [72]. Сравнение последовательности предшественника Hg1 с другими пептидами Кунитц-типа скорпионов позволило обнаружить два пептида из *Hadrurus spadix*, HasKPI-1 и HasKPI-2, сигнальные последовательности которых объединяет высокое сходство с таковой пептида Hg1 (86%). Последовательности зрелого пептида имеют типичное для Кунитц-фолда расположение остатков Cys (рисунок 17). Они различаются точечными заменами по девяти позициям, которые располагаются в основном в области С-конца молекул. Показано, что Hg1 в низких концентрациях специфично блокирует $K_v1.3$, проявляет слабый эффект на кальций-активируемые калиевые каналы SKCa3 и BKCa и не ингибирует токи $K_v1.1$ и $K_v1.2$. Биологическая активность HasKPI-1 и HasKPI-2 в настоящее время не известна, однако остатки сайта основных взаимодействий этих пептидов с протеазами идентичны таковым Hg1, что предполагает наличие трипсинингибирующей активности. Кроме того, в последовательностях HasKPI-1 и HasKPI-2 сохраняются остатки Lys56, Arg57 и Phe61, что также указывает на возможную ингибирующую активность в отношении $K_v1.3$ канала.



Hg1 (P0C8W3) из *H. gertschi*, HasKPI-1 (A0A1W7RA92) и HasKPI-2 (A0A1W7RAB6) из *H. spadix*; LmKTT-1a (P0DJ46), SdPI (P0DJ45), SdPI-2 (P0DJ48) из *L. mucronatus*; BmKTT-1 (P0DJ49), BmKTT-2 (P0DJ50), BmKTT-3 (P0DJ47) из *Buthus martensii*; Kci-1 (A0A0K0LCH3), Kci-4 (A0A0K0LBT2), Kci-5 (A0A0K0LCH2), Kci-4 (A0A0K0LBS7), Kci-7 (A0A0K0LBS1) из *A. bicolor*. P1-остаток реактивного сайта взаимодействий с протеазой. Стрелкой показана позиция отщепления сигнального пептида от зрелого пептида. Идентичные и консервативные остатки показаны темно- и светло-серым цветом соответственно

Рисунок 17 – Выравнивание последовательностей предшественников пептидов Кунитц-типа скорпионов

В настоящее время обнаружено три пептида Кунитц-типа в транскриптоме скорпиона *L. mucronatus* (LmKTT-1a, SdPI, SdPI-2), степень идентичности между которыми составляет 93-98% (рисунок 17) [8,130]. Для LmKTT-1a была установлена структура кодирующего его гена.

Показано, что он состоит из трех экзонов, разделенных двумя интронами; первый экзон кодирует сигнальный пептид и N-концевую последовательность зрелого пептида, второй экзон кодирует большую часть зрелого пептида, третий – С-концевую последовательность зрелого пептида и 3'-нетранслируемую область. Сравнение последовательностей генов LmKTT-1a и известных токсинов K_v скорпиона показало, что этот пептид Кунитц-типа имеет уникальную генную организацию, которая отличается от структуры генов, кодирующих токсины K_v, но совпадает с организацией генов ингибиторов Кунитц-типа змей [9].

Последовательности зрелых пептидов состоят из 59 а.о. и различаются заменами Tyr21Phe в случае SdPI-2, а также Ser26Gly в SdPI. Отличительной особенностью LmKTT является отсутствие дисульфидной связи Cys^{II}-Cys^{IV} вследствие замены остатков Cys13Gly и Cys37Val или Cys37Met, а также появление новой дисульфидной связи на С-конце молекулы в результате замены остатков в позициях 51 и 59 на Cys.

Другое мультигенное семейство пептидов Кунитц-типа обнаружено в транскриптоме скорпиона *Buthus martensii*. В настоящее время описаны также три пептида (BmKTT-1, BmKTT-2 и BmKTT-3), которые по организации кодирующих их генов и структуре предшественников близки LmKTT-пептидам [9]. Степень идентичности последовательностей внутри данной группы составляет 42-51%, тогда как между BmKTT и LmKTT – 39-59%. Однако сигнальные пептиды обеих групп сильно различаются (рисунок 17). Согласно топологии расположения остатков Cys, BmKTT-пептиды можно разделить на три группы. BmKTT-3 имеет расположение остатков Cys, характерное для классических пептидов Кунитц-типа. BmKTT-1, подобно LmKTT-пептидам, содержит два дополнительных остатка Cys на С-конце молекулы, тогда как BmKTT-2 содержит восемь остатков Cys и объединяет обе группы в один мотив [9].

Еще одно мультигенное семейство найдено в транскриптом ядовитого секрета скорпиона *A. bicolor*, которое включает пять представителей (AbKci-1, AbKci-4 – AbKci-7). Транскрипты, кодирующие эти пептиды, составляют 4,8% от общего числа транскриптов. Предполагается, что пептиды Кунитц-типа являются одним из основных компонентов яда этого скорпиона [73]. Предшественники AbKci-4 – AbKci-7 пептидов содержат высококонсервативные сигнальный (21 а.о.) и зрелый (59 а.о.) пептиды (рисунок 17). Степень идентичности между пептидами внутри группы составляет 95-97% и 56-68% с BmKTT-1, LmKTT-1a, SdPI и SdPI-2. Кроме того, обе группы пептидов объединяет идентичное расположение остатков Cys, что указывает на формирование новой группы пептидов Кунитц-типа скорпионов.

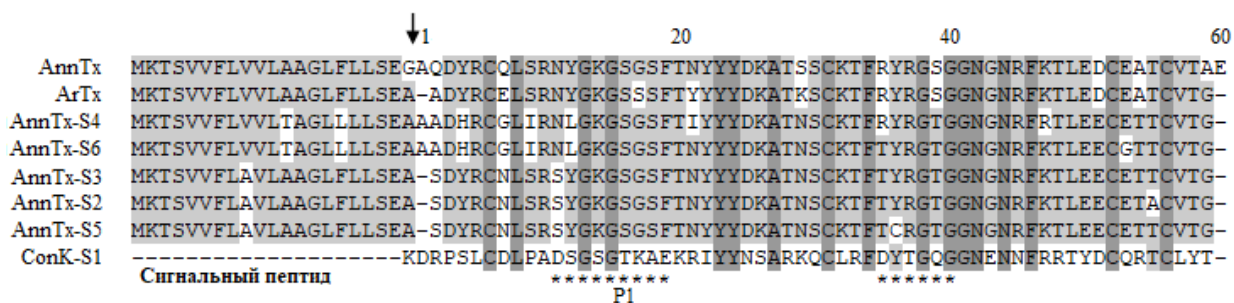
Последовательность сигнального пептида AbKci-1 значительно отличается от таковой AbKci-4 – AbKci-7 (рисунок 17). Сравнение последовательности зрелого пептида с другими пептидами Кунитц-типа скорпионов показало, что AbKci-1 объединяет высокое сходство с

BmKTT-2, включая топологию расположения остатков Cys. Следовательно, оба пептида образуют еще одну группу пептидов Кунитц-типа с отличающимся цистеиновым мотивом [73].

Таким образом, несмотря на небольшое число представителей, пептиды Кунитц-типа скорпионов отличаются разнообразием цистеиновых мотивов, которое, вероятно, возникло в результате ослабления давления очистительного отбора на кодоны, кодирующие остатки Cys, с сохранением общего Кунитц-фолда. Предполагается, что пептиды Кунитц-типа скорпионов, подобно некоторым дендротоксинам змей, находятся на стадии перехода от классических ингибиторов протеаз к токсинам Кунитц-типа, что подтверждается их способностью блокировать Kv1.3 канал. Кроме того, появление новой дисульфидной связи на С-конце молекулы способствует, вероятно, приобретению и развитию новой функции.

1.2.3.3 Мультигенные семейства пептидов Кунитц-типа лягушек

В настоящее время обнаружено семь пептидов Кунитц-типа лягушек семейства Hylidae, включая рода *Hyla* и *Dryophytes*, которые имеют высокомологичные последовательности сигнального пептида: по одному из *H. annectans* (аннтоксин, AnnTx) и *D. arenicolor* (аренин, ArTx) и пять из *H. simplex* (AnnTx-S2 – AnnTx-S6). Предшественники пептидов включают сигнальный пептид (20-21 а.о.) и зрелый пептид (58-59 а.о.) (рисунок 18). Последовательности сигнального пептида отличаются по четырем позициям. Степень идентичности между последовательностями зрелых пептидов составляет 81–99%. Подобно LmKTT-1a из скорпиона *L. mucronatus* и ConK-S1 из конуса *C. striatus*, у аренина и аннтоксинов обнаружены замены двух остатков Cys (Cys15Gly и Cys39Thr/Ser), участвующих в образовании Cys^{II}-Cys^{IV} дисульфидной связи. Тем не менее, ArTx и, вероятно, AnnTx-S2 – AnnTx-S6 имеют типичную укладку Кунитц-типа, как это было показано для AnnTx [7]. В случае AnnTx-S5 наблюдается замена Tyr35Cys. Потеря остатков Cys, участвующих в формировании фолда объясняется, вероятно, снижением давления очистительного отбора на эти остатки и способствует неофункционализации пептидов.



AnnTx (C7AR58) из *H. annectans*; AnnTx-S2 (H6SWL4), AnnTx-S3 (H6SWL2), AnnTx-S4 (H6SWL3), AnnTx-S5 (H6SWL5), AnnTx-S6 (H6SWL1) из *H. simplex*; ArTx (A0A455MWG9) из *D. arenicolor*; ConK-S1 из *C. striatus*. P1 – остаток реактивного сайта связывания с протеазой. Стрелкой показана позиция

отщепления сигнального пептида от зрелого пептида. Идентичные и консервативные остатки показаны темно- и светло-серым цветом соответственно

Рисунок 18 – Выравнивание последовательностей предшественников пептидов Кунитц-типа лягушек

Во всех пептидах в P1-положении сайта сильных взаимодействий с протеазами находится Ser. Однако AppTx проявляет высокую ингибирующую активность в отношении трипсина (K_i $2,3 \times 10^{-8}$ М). Кроме того, данный пептид оказывает слабый ингибирующий эффект на $K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v1.3$ и $K_v2.1$, а также в микромолярных концентрациях ингибирует токи нейронального тетродотоксин-чувствительного Na_v канала [7]. Поскольку Na_v каналы являются мишенью преимущественно нейротоксинов, то аннтоксин был причислен к этой группе соединений.

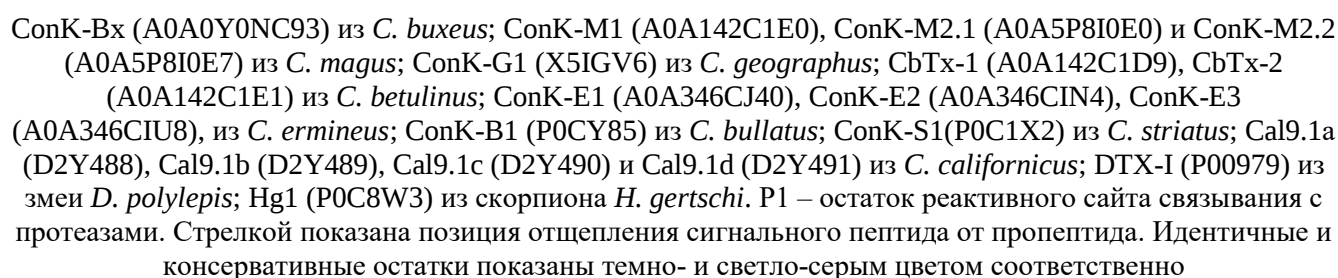
Таким образом, аннтоксин и его высокоомологичные ортологи формируют уникальную группу пептидов Кунитц-типа, действующих на Na_v каналы.

1.2.3.4 Мультигенные семейства пептидов Кунитц-типа моллюсков-конусов

Пептиды Кунитц-типа конусов кодируются мультигенными суперсемействами. Анализ последовательностей показал, что гены пептидов Кунитц-типа *C. magus*, *C. geographus*, *C. ermineus*, *C. buxeus*, *C. bullatus*, *C. betulinus*, *C. californicus* и *C. striatus* образуют три суперсемейства [89–94].

Первое суперсемейство объединяет гены, кодирующие пептиды Кунитц-типа с классическим цистеиновым мотивом. В свою очередь, на основании структуры предшественника это суперсемейство подразделяется на два семейства: первое (C1.1) включает пептиды, предшественники которых не содержат пропептида (ConK-Bx из *C. buxeus*, ConK-M1 из *C. magus*, ConK-G1 из *C. geographus*), второе (C1.2) – с пропептидом (ConK-E1, ConK-E2 и ConK-E3 из *C. ermineus*) (рисунок 19). Степень идентичности пептидов внутри семейств составляет 70-93% для C1.1 и 96-99% для C1.2, тогда как между семействами – 63-68%. Несмотря на отсутствие данных о биологической активности пептидов, можно предположить, что они способны ингибировать протеазы, поскольку в P1-положении пептидов семейства C1.1 находится Arg, а в C1.2 – Lys. Более того, наличие положительно заряженных остатков Lys57 и Arg64 на С-конце молекулы ConK-Bx, соответствующих остаткам Lys56 и Lys63 пептида Hg1 из скорпиона *H. gertschi*, может свидетельствовать о способности ConK-Bx блокировать K_v каналы.

Второе суперсемейство включает пептиды конусов с двумя цистеиновыми мотивами, характерными для Кунитц-фолда. На основании сходства последовательностей предшественников пептиды Кунитц-типа объединяются в два мультигенных семейства.



Семейство C2.2 включает пептиды ConK-B1 из *C. bullatus*, ConK-S1 из *C. striatus*, а также ConK-M2.1 и ConK-M2.2 из *C. magus*, у которых, подобно аннтоксинам лягушек, отсутствует дисульфидная связь Cys^{II}-Cys^{IV}. Пропептиды этого семейства были длиннее на 7 а.о. таковых семейства C2.1. Кроме того, сайт для расщепления субтилизин-подобными протеазами разделен остатком Ser, Thr или Asp. Последовательности зрелых пептидов (57-59

а.о.) семейства C2.2 разделяют от 65 до 99% идентичности. Конкуницин является единственным пептидом этой группы, для которого установлена пространственная структура и изучена биологическая активность [6,18].

Третье мультигенное суперсемейство пептидов Кунитц-типа, включающее четыре представителя, обнаружено в транскриптоме *C. californicus* [89]. Этот вид моллюсков отличается от других представителей рода, он является универсальным хищником, в пищевом рационе которого более 50 различных видов червей, рыб и моллюсков [131]. *C. californicus* обитает в северо-западной части Тихого океана вблизи Калифорнии и Мексики, где является единственным представителем рода [132]. Согласно филогенетическим исследованиям, *C. californicus* отделен от других представителей рода, что вместе с потенциально ослабленной межвидовой конкуренцией, считается, лежит в основе широкого спектра мишеней, а, следовательно, и разнообразия токсинов в ядовитом секрете [133,134].

Предшественники пептидов Кунитц-типа *C. californicus* включают короткий пропептид (5 а.о.), который содержит сайт для расщепления субтилизин-подобными протеазами (Lys-Arg), также найденный у предшественников токсинов актиний и пауков [127,135]. Степень идентичности последовательностей зрелых пептидов составляет более 98%. Единичные замены Glu24Lys, Asp27Asn и Ala52Thr обнаружены в последовательностях Cal9.1d, Cal9.1c и Cal9.1b соответственно (рисунок 19). В отличие от конкуницинов *C. striatus*, *C. bullatus* и *C. magus* пептиды Кунитц-типа *C. californicus* характеризуются наличием шести остатков Cys, расположение которых соответствует классическим пептидам с Кунитц-фолдом. В настоящее время функция этих пептидов все еще не установлена. Сравнение с другими пептидами Кунитц-типа показало, что Cal9.1a имеет 39–41% идентичности с DTX-I из *D. polylepis*, блокатором K_v1.1 и K_v1.2 каналов [89].

Таким образом, отличительным признаком мультигенных семейств пептидов Кунитц-типа моллюсков-конусов является формирование генных суперсемейств на основании высококонсервативных нуклеотидных последовательностей сигнального пептида. Большинство генов кодирует предшественники с коротким пропептидом. Гипервариабельность пептид-кодирующей последовательности связана, вероятно, со специализацией конусов к типу добычи.

1.2.4 Эволюционные аспекты разнообразия пептидов Кунитц-типа

Качественные и количественные изменения состава ядов играют важное значение в жизнедеятельности ядовитых животных при взаимодействии их с окружающей средой. Под влиянием естественного отбора ядовитые животные «стремятся» создать более эффективные и совершенные токсины, в результате чего такие варианты генов успешно «закрепляются» в геноме в процессе эволюции. На основе биологической активности пептида и его функционирования в определенных частях организма-продуцента, пептиды Кунитц-типа делят

на пять классов: ингибиторы трипсина «тела», ингибиторы трипсина яда, ингибиторы химотрипсина яда, бифункциональные токсины и блокаторы K_v каналов [27].

Предполагается, что развитие пептидов Кунитц-типа ядовитых животных шло по пути конвергентной эволюции, когда ген, кодирующий пептид, который участвует в ключевых регуляторных процессах, дублируется, и продукт дочерней копии рекрутируется в ядовитую железу. Считается, что пептиды Кунитц-типа независимо рекрутировались в состав яда стрекающих, моллюсков конусов, насекомых, скорпионов, рептилий и пауков [136]. Например, потерю двух остатков (Ala29 и Lys30) в последовательностях HWTX-XI-подобных пептидов связывают с рекруитментом пептидов в ядовитый секрет пауков [27]. Для большинства дублированных генов действие дизруптивного отбора непродолжительно, в этот период многие копии эффективно эволюционируют нейтральным путем. Однако после, подавляющее большинство паралогов «теряется» из-за накопления «вредных» мутаций, и лишь некоторые генные копии «закрепляются» в геноме, подвергаясь сильному стабилизирующему отбору [137]. Так, в случае некоторых HWTX-XI-подобных пептидов замена высоко консервативного остатка Cys^{IV} могла произойти в результате снижения давления стабилизирующего отбора и дубликации мутантных форм с последующей их дивергенцией [27]. Стоит также отметить, что В-цепи β -бунгаротоксинов, эволюция которых сопровождалась вставками или делециями интронов, характеризуются низкой дивергенцией [100].

Вследствие ослабления давления стабилизирующего отбора на новые копии генов и большего влияния мутационного процесса, создается основа для функциональной (в том числе целенаправленной) дивергенции [137] и образования семейств эволюционно-связанных, но функционально отличающихся генов [138]. Ярким примером являются семейства пептидов Кунитц-типа змей, которые на фоне общей пространственной укладки молекул различаются биологической функцией: одни ингибируют химотрипсин-подобные протеазы [97], другие – ферменты каскада коагуляции крови [105], третьи блокируют K_v каналы [34]. Такое синергетическое действие молекул ядовитого секрета змей позволяет охватить большой спектр мишеней жертвы и усилить его эффект.

Следует отметить, что пептиды вновь созданного мультигенного семейства, как правило, сохраняют пространственную укладку предкового пептида, при этом ключевые функциональные остатки, не отвечающие за образование фолда пептида, подвергаются влиянию движущего отбора. Так, гипервариабельность зрелых последовательностей, наблюдаемая в пептидах Кунитц-типа конусов, объясняется влиянием движущего отбора и быстрой эволюции в ходе экстремальной специализации конусов к типу добычи [139]. Мультигенные суперсемейства пептидов Кунитц-типа конусов характеризуются наличием высококонсервативного сигнального пептида в структуре предшественника [140] и заметным

структурным и функциональным разнообразием зрелых пептидов [141]. Согласно многочисленным исследованиям, действие положительного отбора направлено преимущественно на аминокислотные остатки пептидов Кунитц-типа, расположенные в области протеаза-связывающего сайта, а также N- и C-концов молекул, что, вероятно, способствует неофункционализации токсина за счет изменения его специфичности к существующим и новым мишеням [142]. Эволюционный анализ последовательностей, кодирующих пептиды Кунитц-типа из яда змей и пауков, показал, что у них присутствуют функционально и эволюционно независимые сайты связывания с протеазами и ионными каналами, которые подвергаются сильному давлению движущего отбора. В случае пептидов Кунитц-типа из яда змей замены наблюдаются в обоих сайтах [34,117], тогда как у пауков – только в сайте взаимодействия с протеазами [27].

Таким образом, дупликация генов и конвергентная эволюция привели к формированию мультигенных семейств пептидов Кунитц-типа, а движущий отбор и неофункционализация способствовали формированию функционального разнообразия этой группы пептидов, которое используется животным для усиления биологического эффекта яда при ловле добычи и защите от хищников [137].

1.3 Молекулярные мишени и биологическая активность пептидов Кунитц-типа ядовитых животных

Несмотря на консервативность пространственной укладки, пептиды Кунитц-типа имеют несколько основных мишеней и обладают широким спектром биологической активности. Изначально главными мишенями пептидов Кунитц-типа считались протеолитические ферменты, преимущественно сериновые протеазы [1]. Первый исследованный представитель этой группы, ВРТИ из *B. taurus*, является мощным ингибитором трипсина, α -химотрипсина, плазмина, тромбина, урокиназы, фактора свертываемости крови Ха и калликреина, [3,104,143–146]. Долгое время его активно использовали во время операций сердечно-сосудистой системы, для защиты тканей при остром панкреатите и воспалительных процессах.

Большинство охарактеризованных пептидов Кунитц-типа змей, пауков, скорпионов и актиний способно ингибировать трипсин и/или α -химотрипсин [27,51,101,107,130,147–149]. Некоторые пептиды змей проявляют активность в отношении протеаз, участвующих в свертываемости крови. Так, DrKIn-II из *D. russelii russelii* ингибирует плазмин и факторы коагуляции крови Ха/F11 и Ха/F10 [150], а DrKIn-1 ингибирует протеин С (APC, активируемый фактор свертывания XIV) в присутствии гепарина [151]. Текстилинины 1 и 2 из *P. textilis textilis* [105] и Pr-малгины 2 и 3 из яда *P. rossignolii* [107] являются сильными ингибиторами плазмина. Несмотря на то, что Txln 1 является менее эффективным ингибитором калликреина (плазматического и тканевого), трипсина и плазмина, чем ВРТИ, он более специфично

ингибирует тканевой активатор плазминогена, урокиназу, протеин С и эластазу [152]. Помимо ингибирования сериновых протеаз обнаружены пептиды Кунитц-типа, которые проявляют активность в отношении других ферментов. Так, ShPI-1 из актинии *S. helianthus* проявляет широкую специфичность в отношении как сериновых (трипсин, α -химотрипсин, плазмин, калликреин и эластаза), так и цистеиновых (бромелаин и папаин) и аспарагиновых (пепсин) протеаз [53], а Pr-малгин 1 из змеи *Pseudechis rosignolii* специфично ингибирует металлопротеазу 2 (MMP-2) [107].

Другой мишенью пептидов Кунитц-типа ядовитых животных являются ионные каналы и рецепторы, участвующие в передаче сигнала и регуляции гомеостаза клеточных процессов. Ярким примером пептидов Кунитц-типа, блокирующих K_v , являются дендротоксины змей, большинство из которых утратило способность ингибировать протеазы [34]. Так, DTX-K из *D. polylepis* и DTX- δ из *D. angusticeps* являются мощными блокаторами $K_v1.1$ [111,153], DTX-I из *D. polylepis* блокирует $K_v1.1$ и $K_v1.2$ [14], а DTX- α из *D. angusticeps*, блокирует $K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v1.6$ и некоторые подтипы кислото-чувствительных ионных каналов (ASICs) [34,154]. Пептид HWTX-XI из паука *O. huwena* блокирует $K_v1.1$, $K_v1.2$ и $K_v1.3$ [27]. Пептиды Кунитц-типа скорпионов BmKTT-1 и BmKTT-2 из *B. martensii*, блокируют $K_v1.3$ на 80%, а LmKTT-1a из *L. mucronatus* – на 50% [155]; пептид Hg1 из скорпиона *H. gertschi* является сильным блокатором $K_v1.3$ канала, но, в отличие от дендротоксинов и HWTX-XI, этот пептид использует С-концевой фрагмент молекулы [72].

Другим примером блокаторов K_v являются пептиды Кунитц-типа актиний и конусов. Так, каликлудины (AsKC1-3) актинии *A. viridis* ингибируют трипсин и блокируют $K_v1.2$ [51]; HCRG2 из *H. crispa* блокирует $K_v1.1$ – $K_v1.3$, $K_v1.6$ и *Shaker* IR, а HCRG1 – $K_v1.3$ [156]; пептид ShPI-1 из актинии *S. helianthus* блокирует $K_v1.1$, $K_v1.2$ и $K_v1.6$ [157]. ConK-S1 из *C. striatus* является поровым блокатором *Shaker* канала, причем важную роль в ингибировании токов канала играют остатки на С-конце пептида [6,18].

Блокатор потенциал-зависимых кальциевых каналов (Ca_v), названный кальциклудином, был обнаружен в ядовитом секрете змеи *D. angusticeps*. Показано, что он специфично блокирует большинство L-, N- и P-типов Ca_v каналов [158,159]. Единственным известным на сегодняшний день пептидом Кунитц-типа, блокирующим потенциал-чувствительные натриевые каналы (Na_v), является аннтоксин из лягушки *H. annectans*. Этот пептид ингибирует токи нейронального тетродотоксин-чувствительного Na_v канала, а также оказывает слабое блокирующее действие на $K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v1.3$ и $K_v2.1$ каналы [7].

Пептиды APHC1-APHC3 и HCRG21 из актинии *H. crispa* ингибируют активность неселективного ионного канала TRPV1 [30–32,160]. При этом APHC1 и APHC3 частично ингибируют канал, активированный капсаицином, проявляя анальгетическое действие, а

АРНС3 ингибирует TRPV1, активированный понижением pH, что характерно для местного воспаления [32]. Другой пептид Кунитц-типа из этой актинии, HCRG21, является первым полным блокатором TRPV1 канала [33]. Несмотря на низкую аффинность к каналу, HCRG21 ингибирует на 95% капсаицин-индуцированные токи, проходящие через этот канал.

Еще один пептид из яда змеи *D. angusticeps*, мамбакваретин-1, показал специфичное связывание с рецептором вазопресина 2-го типа (V2R). Этот пептид является полным антагонистом V2R, посредством которого активируется синтез цАМФ, взаимодействие с β -арестином и активация MAP киназы, гиперактивность которых в нефронах ведет к развитию поликистоза почек [161].

Таким образом, широкая представленность пептидов Кунитц-типа в ядовитом секрете животных свидетельствует об их важности в качестве активного компонента яда. Несмотря на консервативность пространственной организации, пептиды Кунитц-типа взаимодействуют с разнообразными мишенями, что позволяет рассматривать их в качестве потенциальных фармакологических агентов. С другой стороны, открытие новых пептидов посредством протеомного и транскриптомного подходов создает предпосылки к изучению новых свойств и возможностей пептидов Кунитц-типа.

Заключение

Суммируя вышесказанное можно отметить, что эволюционное развитие мультигенных семейств пептидов Кунитц-типа в геномах ядовитых животных шло по пути конвергентной эволюции и рекруитмента их генов в ядовитую железу с последующей дупликацией и диверсификацией под действием движущего отбора. Несмотря на общую организацию генов, кодирующих пептиды Кунитц-типа, вариация структуры их предшественников между группами ядовитых животных свидетельствует о дивергенции пептидов в процессе эволюции и их адаптации к окружающей среде. Широкая представленность пептидов Кунитц-типа в ядовитом секрете и взаимодействие их с различными мишенями формирует синергетический эффект действия яда в отношении жертвы. С другой стороны, проявление разнообразной биологической активности позволяет рассматривать пептиды Кунитц-типа в качестве перспективных фармакологических соединений направленного действия. Поэтому изучение отдельных изоформ пептидов Кунитц-типа и их синергетическое действие представляет как фундаментальный, так и прикладной интерес.

2 Результаты и обсуждение

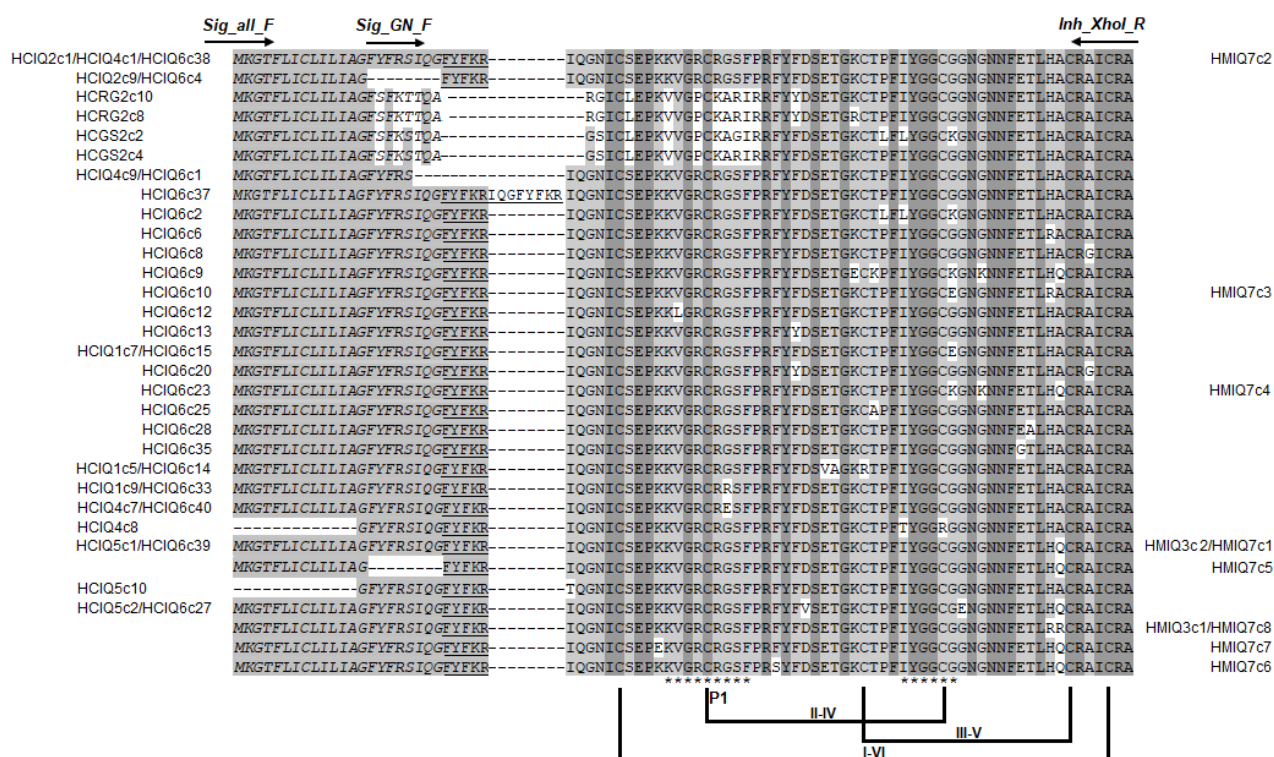
2.1 Изучение представленности и разнообразия IQ-пептидов Кунитц-типа актиний *Heteractis crispa* и *Heteractis magnifica*

Как описывалось выше, в ядовитом секрете актинии *H. crispa* пептиды Кунитц-типа представлены в виде комбинаторной библиотеки, состоящей из однодоменных HCGS-, HCRG-, HCGG- и HCGN- пептидов, кодируемых мультигенным GS-семейством [46]. Группа HCGN была представлена только одним предшественником пептида с частично установленной последовательностью, которая отличалась от представителей других групп аминокислотными заменами на С-конце сигнального пептида, наличием пропептида с протеолитическим сайтом Lys-Arg и двух дополнительных остатков Ile-Gln на N-конце зрелого пептида. Очевидно, что зрелый пептид начинается не с Gly-Asn (GN), как предполагалось ранее, а с Ile-Gln (IQ), находящихся после сайта расщепления. Поэтому эта группа пептидов была переименована в HCIQ (IQ-пептиды *H. crispa*). Ввиду отсутствия информации о полноразмерной последовательности, представленности и разнообразии изоформ, а также о проявляемой биологической активности, группа IQ-пептидов Кунитц-типа представляет значительный интерес как для фундаментальной науки, так и для фармакологии. Настоящее исследование направлено на изучение структурно-функционального разнообразия данных соединений актиний *H. crispa* и близкородственного вида *H. magnifica*. В работе установлены и проанализированы последовательности транскриптов, кодирующие IQ-пептиды, получены рекомбинантные аналоги пептидов и изучена их биологическая активность.

2.1.1 Идентификация последовательностей транскриптов, кодирующих IQ-пептиды

Две нуклеотидные последовательности (НП) IQ-пептидов (*HCIQ2c1* и *HCIQ2c9*) были получены путем амплификации кДНК *H. crispa* с ген-специфичными праймерами [46], комплементарными высококонсервативным участкам, кодирующим 5'-конец сигнального пептида (SIG_all_F) и 3'-конец зрелых (Inh_XhoI_R) HCGS-пептидов. Полученные ПЦР-фрагменты длиной около 280 п.н. были очищены, клонированы в вектор pTZ57R/T и секвенированы. С этим набором праймеров также были получены НП, кодирующие предшественники HCGS- (HCGS2c2 и HCGS2c4) и HCRG- (HCRG2c8 и HCRG2c10) пептидов (рисунок 20). Открытые рамки считывания содержали 255 п.н. для *HCIQ2c1* и 231 п.н. для *HCIQ2c9*. НП транскрипта *HCIQ2c9* отличалась от *HCIQ2c1* отсутствием фрагмента, кодирующего С-концевую последовательность сигнального пептида. Выведенные аминокислотные последовательности (АП) предшественников *HCIQ2c1* (85 а.о.) и *HCIQ2c9* (77 а.о.) включали сигнальный пептид (22 и 14 а.о. соответственно), пропептид (5 а.о.) и зрелый пептид (58 а.о.). Наличие сигнального пептида в предшественнике указывает на то, что IQ-

пептиды являются секретирруемыми. Первые пятнадцать остатков сигнального пептида были идентичны таковым пептидов HCGS и HCRG, тогда как в остальной части сигнального пептида были обнаружены аминокислотные замены. Протеолитический сайт Lys-Arg (KR) пропептида располагается в позициях 26–27 (нумерация для HClQ2c1). Этот сайт распознается субтилизин/кексин-подобными эндопротеазами, что приводит к высвобождению функционально-активной формы токсинов. Подобный сайт был обнаружен в предшественниках актинопооринов [135,162,163] и нейротоксинов [44,164,165], входящих в состав ядовитого секрета актиний. Таким образом, на основании высокой идентичности N-концевого участка сигнальных последовательностей HClQ-, HCGS- и HCRG-пептиды, вероятно, принадлежат одному семейству. Тем не менее, различия на С-конце сигнальных пептидов и наличие пропептида позволяют выделить представителей HClQ в отдельное подсемейство.



P1 – реактивный сайт связывания пептида с протеазами. Звездочками показаны сайты сильных и слабых взаимодействий. Сигнальный пептид показан курсивом, пропептид подчеркнут. Схема дисульфидных связей показана снизу. Идентичные и консервативные аминокислотные остатки выделены темно- и светло-серым цветом соответственно

Рисунок 20 – Множественное выравнивание последовательностей предшественников пептидов Кунитц-типа актиний

Ранее в мукусном секрете *H. magnifica* были обнаружены пептиды Кунитц-типа, идентичные таковым *H. crista* [122]. Поэтому для поиска транскриптов, кодирующих IQ-пептиды *H. magnifica*, была использована кДНК, синтезированная на основе общей РНК тканей

щупалец этой актинии. Для идентификации транскриптов IQ-пептидов был сконструирован прямой праймер (SIG_GN_F), комплементарный НП участка сигнального пептида, уникального для предшественников IQ-пептидов (рисунок 20). В результате амплификации кДНК *H. crispa* и *H. magnifica*, клонирования и секвенирования полученных фрагментов (200 п.н.) были установлены НП, кодирующие девять изоформ HSIQ- и две изоформы HMIQ-пептидов (где HM – *Heteractis magnifica*) (рисунок 20). Наиболее представленными изоформами *H. crispa* были HSIQ4c1 (68,75%), идентичная HSIQ2c1, и HSIQ5c1 (12,5%), тогда как для *H. magnifica* – HMIQ3c2 (80,7%), которая оказалась идентичной HSIQ5c1; остальные последовательности встречались в единичных копиях. Анализ НП показал, что они содержат участки, кодирующие С-концевой фрагмент сигнального пептида, про- и зрелый пептид. Исключение составил транскрипт *HSIQ4c9*, у которого отсутствовал пропептид-кодирующий фрагмент, также ранее не обнаруженный в транскриптах HCGS-пептидов [46]. Однако НП, кодирующая зрелый пептид HSIQ4c9, оказалась идентичной таковой HSIQ2c1. Было сделано предположение, что *HSIQ4c9* является переходной (промежуточной) формой между генами, кодирующими HCGS- и HSIQ-пептиды. В результате использования методов молекулярного клонирования и секвенирования по методу Сэнгера было идентифицировано 11 изоформ HSIQ- и две изоформы HMIQ-пептидов.

Для понимания существующего разнообразия НП IQ-пептидов в транскриптомах актиний рода *Heteractis* был применен метод глубокого секвенирования ампликонов с использованием химерных праймеров (A_Mid1sig_allF/A_Mid2sig_allF и B_inh_R), позволяющих амплифицировать транскрипты пептидов Кунитц-типа. Современные транскриптомные подходы, основанные на применении секвенирования нового поколения (NGS, next generation sequencing), облегчают получение исчерпывающей информации о последовательностях, кодирующих разные группы пептидов и белков, включая редкие изоформы, которые составляют протеом ядовитого секрета морских анемонов [52,55,57,122]. В результате амплификации кДНК *H. crispa* с парой праймеров A_Mid1sig_allF/B_inh_R был идентифицирован 25201 рид (прочтение). Из них 965 (3,83%) прочтений приходится на HSIQ-транскрипты, из которых 764 (79,1%) имели корректную рамку считывания, 174 (18,1%) транскрипта были со сбитой, а 27 (2,8%) транскриптов – с усеченной рамкой считывания. Все последовательности с корректной рамкой считывания кодировали высококонсервативные сигнальный пептид и пропептид; только 68 прочтений содержали синонимичные замены в этих участках. Транскрипт *HSIQ6c37* содержал повтор пропептид-кодирующей области (рисунок 20).

В результате амплификации кДНК *H. magnifica* со второй парой праймеров (A_Mid2sig_allF/B_inh_R) было получено 22229 прочтений. После тримминга по качеству

(«обрезание» концов ридов) и удаления димеров праймеров осталось 14175 прочтений. Из них 93 (0,42%) прочтения были отнесены к транскриптам IQ-пептидов. Низкое содержание транскриптов, кодирующих IQ-пептиды, может быть связано с неудовлетворительным качеством прочтений, что сказалось на числе взятых в анализ последовательностей. Из дальнейшего анализа было исключено 9 (9,68%) прочтений, кодирующих усеченные изоформы IQ-пептидов. В результате было установлено, что оставшиеся 84 прочтения кодируют 50 уникальных транскриптов с покрытиями от одного до 17, которые транслируются в 34 изоформы IQ-пептидов с покрытиями от одного до 27. Среди предшественников НМІQ-пептидов были обнаружены две структуры, с пропептидом (большинство последовательностей) и без С-концевого сигнального участка (НМІQ7с5).

В результате объединения всех данных было установлено четыре структурных варианта предшественников IQ-пептидов: 1) с пропептидом (большинство предшественников НСІQ- и НМІQ-пептидов); 2) с tandemным повтором пропептида (НСІQ6с37); 3) без пропептида (НСІQ4с9); 4) без С-концевого сигнального участка (НСІQ2с9 и НМІQ7с5). Из литературных данных, tandemные повторы сигнального пептида и пропептида были обнаружены только в структуре предшественников пептидов Кунитц-типа паука *O. huwena* [166]. Считается, что эти повторы вместе с гипермутацией и пост-трансляционной модификацией формируют у этих животных разнообразие токсинов Кунитц-типа.

Согласно литературным данным, основная функция пропептида в предшественнике токсина – защита тканей животного от его токсического действия [167]. Кроме того, пропептид может участвовать в процессах формирования пептидного фолда, выполняя функцию шаперона [168,169]. Короткие пропептиды (6 а.о.) были обнаружены в предшественниках пептидов Кунитц-типа моллюска *C. californicus* [89] и некоторых видов пауков [27,125,166,170], в том числе с редко встречающимся протеолитическим сайтом Lys-Arg. Важно отметить, что ранее пропептид в предшественниках известных пептидов Кунитц-типа актиний не был обнаружен, тогда как для предшественников других токсинов, таких как нейротоксины и актинопорины, наличие пропептида весьма характерно [44,135,162,163,165,171]. На основании этих данных нами сделано предположение, что включение пропептида в структуру предшественников IQ-пептидов может указывать на их рекруитмент в качестве токсинов в ядовитый секрет морских анемонов.

В результате анализа выведенных АП было идентифицировано 96 изоформ НСІQ-пептидов (обозначены как НСІQ6с1-НСІQ6с96) и 34 изоформы НМІQ-пептидов (обозначены как НСМQ7с1-НСМQ7с34). Изоформы, кодирующиеся менее чем тремя копиями (14,0% для *H. crista* и 30,9% для *H. magnifica*), далее не рассматривались. Из 22 изоформ *H. crista* наиболее представленными были НСІQ6с38 (520 транскриптов), НСІQ6с15 (17 транскриптов) и

НСІQ6с39 (8 транскриптов) (рисунок 21, А). Среди восьми изоформ *H. magnifica* наиболее представленными были НМІQ7с1 (27 транскриптов), НМІQ7с2 и НМІQ7с3 (по 9 транскриптов) (рисунок 21, Б). Сравнение АП НСІQ-пептидов показало, что изоформы, НП которых были получены методом секвенирования по Сэнгеру, за исключением НСІQ4с8 и НСІQ5с10, были идентичны изоформам, выведенным из данных NGS ампликонов (рисунок 20). Так, высококопийные изоформы НСІQ2с1 и НСІQ5с1 оказались идентичны высококопийным изоформам НСІQ6с38 и НСІQ6с39, соответственно, тогда как высококопийная изоформа НСІQ6с15 соответствовала низкокопийной НСІQ1с7. Редкие изоформы НСІQ1с5 (=НСІQ6с14), НСІQ1с9 (=НСІQ6с33), НСІQ4с7 (=НСІQ6с40) и НСІQ5с2 (=НСІQ6с27) в обоих случаях были представлены единичными копиями транскриптов (рисунок 20). В результате анализа НМІQ-пептидов было установлено, что НМІQ3с1 и НМІQ3с2, НП которых получены секвенированием по Сэнгеру, также были обнаружены при глубоком секвенировании ампликонов и соответствовали НМІQ7с8 и НМІQ7с1. Изоформы НМІQ7с2, НМІQ7с3 и НМІQ7с4 соответствовали НСІQ2с1, НСІQ6с10 и НСІQ6с23 (рисунок 20). Примечательно, что наиболее представленной изоформой пептидов Кунитц-типа *H. crispa* является НСІQ2с1, тогда как в *H. magnifica* превалирует НМІQ7с1 (=НСІQ5с1). Уникальными для *H. magnifica* изоформами являются НМІQ7с6 и НМІQ7с7, транскрипты которых были обнаружены только при глубоком секвенировании ампликонов. В результате применения метода NGS дополнительно было идентифицировано 13 изоформ НСІQ- и шесть изоформ НМІQ-пептидов. Полученные данные свидетельствуют о более высокой эффективности высокопроизводительного секвенирования по сравнению с классическим секвенированием по Сэнгеру для получения минорных изоформ IQ-пептидов.

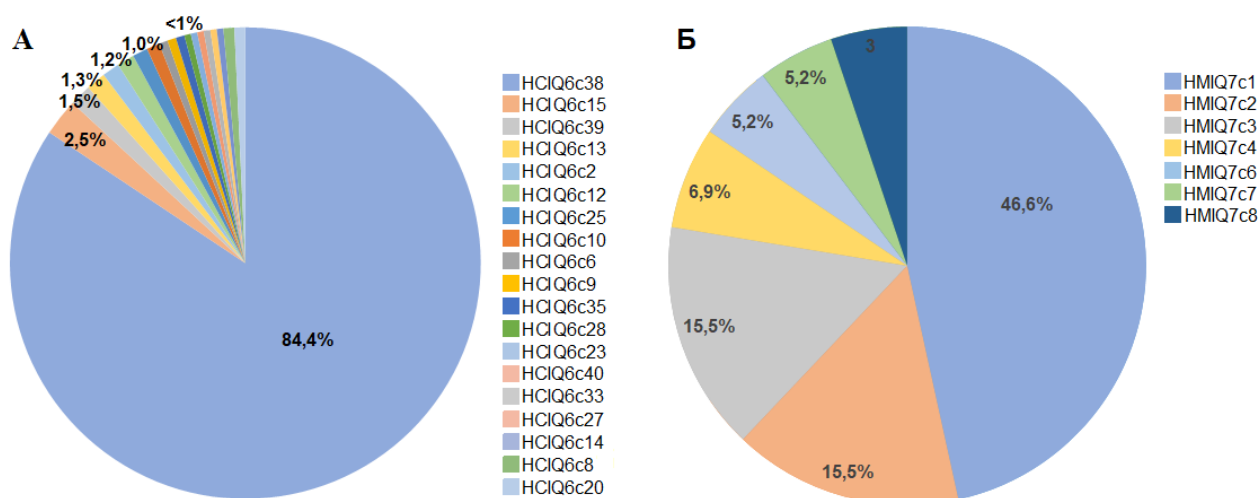


Рисунок 21 – Разнообразие НСІQ- (А) и НМІQ- (Б) изоформ

Особенностью пептидов Кунитц-типа является наличие шести консервативно-расположенных остатков Cys, которые образуют три дисульфидные связи, стабилизирующие Кунитц-фолд (рисунок 20). Анализ цистеиновых кодонов показал, что для всех остатков Cys IQ-пептидов характерна высокая позиционно-специфичная консервативность и инвариантность. Так, остатки Cys^I и Cys^{II} кодируются триплетами TGT, Cys^{III}, Cys^V и Cys^{VI} – TGC, тогда как Cys^{IV} кодируется как TGT (85,4%), так и TGC (12,7%). Идентичная ситуация наблюдалась и в случае НП HCGS-пептидов, за исключением Cys^{IV}, который кодируется преимущественно триплетом TGC (66%) [46]. Предполагается, что сохранение консервативности Cys кодонов в гипервариабельных областях осуществляется на генетическом уровне посредством «защитных» молекул, которые связываются с цистеиновыми кодонами, чтобы защитить их от повышенного мутагенеза, который может происходить в непосредственной близости [172]. Тем не менее, среди транскриптов HClQ-пептидов были обнаружены HClQ1c5 и HClQ4c8 с заменой кодона Cys39 (нумерация по HClQ4c8) на Arg-кодирующий, что ранее не было выявлено среди представителей мультигенного GS-семейства. По-видимому, в данном случае наблюдается ослабление механизма «защиты» цистеиновых кодонов от действия ускоренной эволюции [173].

*Таким образом, применение классических и современных методов молекулярной биологии к идентификации транскриптов, кодирующих IQ-пептиды Кунитц-типа актиний *H. crispa* и *H. magnifica*, позволило получить 24 изоформы HClQ- и восемь изоформ HMIQ-пептидов. Согласно полученным данным, большее разнообразие изоформ IQ-пептидов наблюдалось для *H. crispa*, чем для *H. magnifica*. Установлены четыре структурных варианта предшественников IQ-пептидов: 1) содержащих пропептид (большинство предшественников HClQ- и HMIQ-пептидов); 2) содержащих тандемный повтор пропептида; 3) не содержащих пропептид; 4) не содержащих С-концевой сигнальный участок. Установлено, что кодоны остатков Cys в НП HClQ-пептидов высококонсервативны и сохраняют строгую инвариантность.*

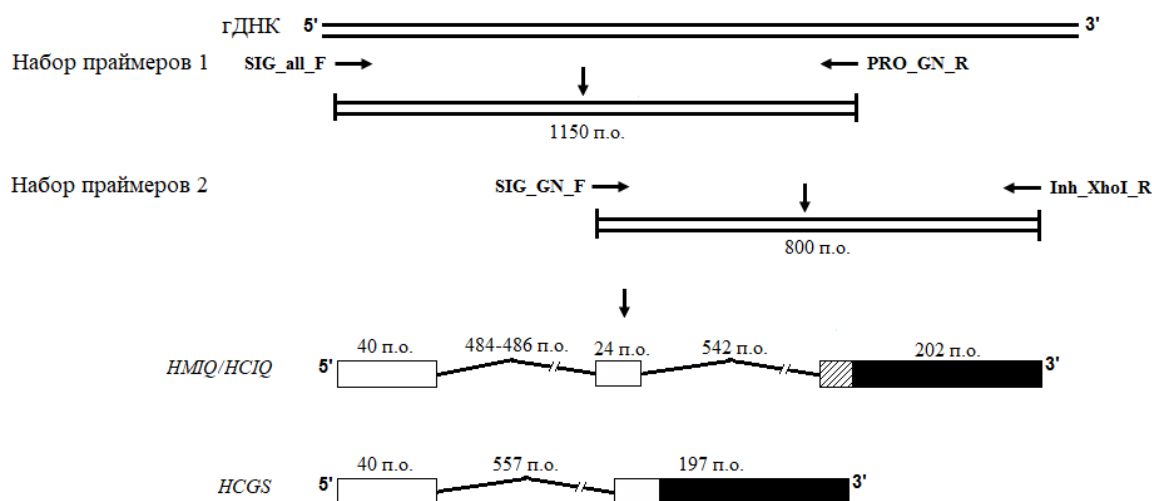
2.1.2 Установление структурной организации генов IQ-пептидов

В настоящее время из актиний выделено и охарактеризовано большое количество пептидов Кунитц-типа. Однако все еще недостаточно накоплено сведений о структурной организации генов, кодирующих этот класс соединений, и об эволюционных процессах, направленных на формирование структурного разнообразия пептидов. Впервые экзон-интронная структура была описана для генов, кодирующих HCGS-пептиды *H. crispa* [46]. Установлено, что они состоят из двух экзонов, разделенных интроном (рисунок 23).

Для выяснения структурной организации генов IQ-пептидов *H. crispa* и *H. magnifica* были использованы две пары ген-специфичных праймеров, SIG_all_F/PRO_GN_F (набор праймеров 1) и SIG_GN_F/Inh_XhoI_R (набор праймеров 2), фланкирующих белок-

кодирующий участок генов IQ-пептидов. В качестве матриц в ПЦР использовали геномную ДНК (гДНК) и кДНК. В результате амплификации гДНК *H. crista* и *H. magnifica* полученные ПЦР-фрагменты оказались примерно одинаковой длины и составили около 1150 н.п. (с набором праймеров 1) и 800 н.п. (с набором праймеров 2) (рисунок 22). ПЦР-фрагменты при амплификации кДНК были короче ПЦР-фрагментов гДНК на 1000 н.п. и 600 н.п., соответственно, что может указывать на присутствие интронов в структуре гена. Все полученные ПЦР-фрагменты были клонированы, секвенированы и собраны в последовательности.

В результате анализа НП установлено, что в отличие от генов HCGS-пептидов, гены IQ-пептидов содержат три экзона и два интрона. Первый IQ-интрон расположен внутри НП, кодирующей сигнальный пептид (экзоны 1 и 2), в то время как второй интрон отделяет экзон 3, кодирующий про- и зрелый пептид, от НП, кодирующей сигнальный пептид (рисунок 22).



Экзоны, кодирующие сигнальный пептид, показаны в виде белых прямоугольников; участки экзона, кодирующие прочую часть и зрелый пептид, показаны в виде полосатого и черного прямоугольников соответственно. Горизонтальные стрелки указывают направление праймеров. Длины ПЦР-фрагментов показаны под линиями. Длины экзонов и интронов указаны сверху

Рисунок 22 – Схема установления структуры гена HSIQ/HMIQ-пептидов

При сравнении последовательностей транскриптов и генов были найдены границы экзонов и интронов. Все экзон-интронные границы следовали правилу GT/AG. Сравнение *HSIQ*- и *HMIQ*-интронов показало высокую идентичность НП (99–100%), тогда как степень идентичности обоих интронов между собой составила около 60%. НП первого интрона отличались друг от друга количеством повторяющихся СА-элементов (5–6 повторов), функциональная важность которых мало изучена в настоящее время. Известно, что СА-повторы могут влиять на уровень экспрессии генов и регуляцию сплайсинга: более длинные СА-элементы усиливают сплайсинг, более короткие – замедляют его [174,175]. НП первого IQ-

интрона разделяют 93-95% идентичности с таковой HCGS-интрона. НП второго IQ-интрона были менее консервативны и не содержали СА-повторов. Анализ последовательностей генов HSIQ- и HMIQ-пептидов показал, что интроны условно разделяют высоко- и менее консервативные участки, кодирующие сигнальный пептид, а также области, кодирующие менее консервативный сигнальный и вариабельный зрелый пептид. Эта особенность характерна для генов токсинов ядовитых животных, таких как конусы и скорпионы [176,177]. Известно, что скорость эволюции участков генов, разделенных интронами, различается. Как правило, участки генов, кодирующие зрелые пептиды, эволюционируют быстрее и более подвержены процессу диверсификации [178]. Высокая степень идентичности последовательностей, кодирующих сигнальный пептид, и интронов может свидетельствовать о принадлежности генов к одному мультигенному семейству [138]. На основании полной идентичности последовательностей экзона 1, кодирующего сигнальный пептид, и высокой идентичности первого интрона генов IQ-пептидов с интроном генов HCGS-пептидов, мы полагаем, что они относятся к одному мультигенному семейству. Однако появление второго IQ-интрона и участка, кодирующего пропептид, а также вариабельность участков, кодирующих С-концевой сигнальный пептид, могут указывать на формирование IQ-генами отдельного подсемейства внутри GS-семейства.

*Таким образом, впервые установлена структурная организация генов, кодирующих IQ-пептиды Кунитц-типа актиний *H. crispa* и *H. magnifica*. В пределах кодирующей последовательности гена обнаружено присутствие двух интронов, которые условно разделяют высококонсервативные и вариабельные области. На основании различий в структуре генов пептидов Кунитц-типа, гены IQ-пептидов формируют отдельное подсемейство внутри мультигенного GS-семейства.*

2.1.3 Сравнительный анализ изоформ IQ-пептидов

Расчетные значения молекулярной массы, заряда, количества заряженных остатков и pI зрелых изоформ IQ-пептидов актиний рода *Heteractis* представлены в таблице 1. Установлено, что для IQ-пептидов характерен узкий диапазон молекулярных масс (6258,09–6557,46 Da) и значений pI (9,78–10,74), но достаточно широкий, как у HCGS-пептидов с Lys в P1-положении [46], диапазон величин положительного заряда молекулы (+2,82–+6,09). Изоформы IQ-пептидов различаются между собой количеством заряженных (12–15) и гидрофобных (23–28) остатков. Наиболее представленными являются изоформы с зарядом +4 (56%), остальные имеют величины заряда +2 (4%), +3 (7%), +5 (22%) и +6 (11%).

Сравнение изоформ IQ- и GS-пептидов показало, что степень идентичности между ними составляет 73–99%. Основные различия между группами пептидов локализуются в области N-концевого фрагмента молекул: IQ-пептиды имеют уникальные аминокислотные замены Asn4 и Ser7, а также два дополнительных N-концевых остатка Ile1 (Thr1 в случае HSIQ5c10) и Gln2.

Таблица 1 – Физико-химические характеристики зрелых IQ-пептидов

№/ п	Пептид*	Молекулярная масса, Da	Заряд при рН 7,0	Количество заряженных остатков		pI
				положительный	отрицательный	
1	НСIQ1c5/НСIQ6c14	6324,19	+5,57	9	3	10,74
2	НСIQ1c9/НСIQ6c33	6429,29	+4,66	9	4	10,18
3	НСIQ1c7/НСIQ6c15	6402,22	+3,09	8	5	9,78
4	НСIQ2c1/НСIQ6c38/ НСМQ7c2	6330,15	+3,84	8	4	10,73
5	НСIQ2c9/НСIQ6c4*	6330,15	+3,84	8	4	10,73
6	НСIQ4c7/НСIQ6c40	6404,10	+2,82	8	5	10,17
7	НСIQ4c8	6372,15	+4,73	9	4	10,19
8	НСIQ4c9/НСIQ6c1*	6330,15	+3,84	8	4	10,73
9	НСIQ5c1/НСIQ6c39/ НСМ3c2/НСМQ7c1	6387,21	+4,09	8	4	9,96
10	НСIQ5c2/НСIQ6c27	6443,31	+3,87	8	4	10,55
11	НСIQ5c10	6318,10	+4,09	8	4	10,02
12	НСIQ6c2	6417,32	+5,09	9	4	10,08
13	НСIQ6c6	6349,2	+4,99	9	4	10,12
14	НСIQ6c8	6316,13	+4,09	9	4	9,96
15	НСIQ6c9	6557,46	+5,09	10	5	10,04
16	НСIQ6c10/НСИQ7c3	6421,26	+4,00	9	5	9,96
17	НСIQ6c12	6344,18	+4,09	8	4	9,96
18	НСIQ6c13	6346,15	+4,09	8	4	9,89
19	НСIQ6c20	6332,13	+4,09	8	4	9,89
20	НСIQ6c23/НСИQ7c4	6529,45	+6,09	10	4	10,18
21	НСIQ6c25	6300,13	+4,09	8	4	9,96
22	НСIQ6c28	6300,13	+4,09	8	4	9,96
23	НСIQ6c35	6258,09	+5,08	8	3	10,12
24	НСIQ6c37*	6330,15	+3,84	8	4	10,73
25	НСИQ3c1/НСИQ7c8	6434,0	+5,99	10	4	10,27
26	НСИQ7c6	6327,11	+4,09	8	4	9,96
27	НСИQ7c7	6388,15	+2,09	7	5	9,57
* изоформы, имеющие уникальную структуру предшественника и АП зрелого пептида, идентичную НСИQ2c1.						

В изоформах IQ-пептидов так же, как и у других пептидов Кунитц-типа, присутствуют два сайта связывания с протеазами: сайт сильных взаимодействий, находящийся в положениях 11–19, и сайт слабых взаимодействий – в положениях 35–40 (рисунок 23). Согласно

исследованиям комплексов ВРТИ с трипсином и α -химотрипсином, оба сайта принимают участие в связывании пептида с данными сериновыми протеазами, при этом основной вклад в распознавание активного центра фермента и энергию ассоциации их комплексов вносят аминокислотные остатки сайта сильных взаимодействий в положениях P1-P1', которые создают большинство контактов с функционально значимыми остатками протеаз [25,179]. Все изоформы IQ-пептидов содержат остаток Arg в положении P1 (IQ-R), в отличие от HCGS-пептидов, у которых в положении P1 присутствуют как остатки Arg (HCGS-R), так и Lys (HCGS-K) и Thr (HCGS-T) (рисунок 23). Сравнение аминокислотных остатков сайта сильных взаимодействий выявило высокую идентичность IQ-пептидов *H. crispa* и *H. magnifica* с HCGS-R, представителем которых является HCGS1.19, ингибирующий трипсин [149], и SHPI-1, политаргетный пептид Кунитц-типа из *S. helianthus*, который ингибирует сериновые, цистеиновые и аспарагиновые протеазы, а также блокирует Kv1.1, Kv1.2, Kv1.6 каналы [157]. На примере комплексообразования мутантных пептидов ВРТИ с трипсином было показано, что остатки Lys или Arg в положении P1 обуславливают высокоаффинное связывание с ферментом посредством электростатических и гидрофобных взаимодействий [25,180]. В положении P1' реактивного сайта IQ-пептидов располагается Gly, за исключением HClQ1c9 и HClQ4c7, у которых в этом положении находятся остатки Arg и Glu соответственно.

	1	20	40	60	
HClQ2c1	-IQGNICSEPKKVGR	CRGSFPRFYDSETGKCTPFIYGGCGGNGNNFETLHACRAICRA-			
HClQ5c1	-IQGNICSEPKKVGR	CRGSFPRFYDSETGKCTPFIYGGCGGNGNNFETLHACRAICRA-			
HClQ5c10	-IQGNICSEPKKVGR	CRGSFPRFYDSETGKCTPFIYGGCGGNGNNFETLHACRAICRA-			
HClQ1c9	-IQGNICSEPKKVGR	CRRSFPRFYDSETGKCTPFIYGGCGGNGNNFETLHACRAICRA-			
HClQ4c7	-IQGNICSEPKKVGR	CRSEFPRFYDSETGKCTPFIYGGCGGNGNNFETLHACRAICRA-			
HClQ4c8	-IQGNICSEPKKVGR	CRGSFPRFYDSETGKCTPFIYGGCGGNGNNFETLHACRAICRA-			
HClQ1c5	-IQGNICSEPKKVGR	CRGSFPRFYDSEVAGKRTPIYGGCGGNGNNFETLHACRAICRA-			
HClQ5c2	-IQGNICSEPKKVGR	CRGSFPRFYFVSETGKCTPFIYGGCGGNGNNFETLHACRAICRA-			
HClQ6c2	-IQGNICSEPKKVGR	CRGSFPRFYDSETGKCTLFYGGCKGNGNNFETLHACRAICRA-			
HClQ6c9	-IQGNICSEPKKVGR	CRGSFPRFYDSETGECKPFIYGGCKGNGNNFETLHACRAICRA-			
HClQ6c23	-IQGNICSEPKKVGR	CRGSFPRFYDSETGKCTPFIYGGCKGNGNNFETLHACRAICRA-			
HClQ1c7	-IQGNICSEPKKVGR	CRGSFPRFYDSETGKCTPFIYGGCEGNGNNFETLHACRAICRA-			
HClQ6c10	-IQGNICSEPKKVGR	CRGSFPRFYDSETGKCTPFIYGGCEGNGNNFETLHACRAICRA-			
HClQ6c6	-IQGNICSEPKKVGR	CRGSFPRFYDSETGKCTPFIYGGCGGNGNNFETLHACRAICRA-			
HMIQ3c1	-IQGNICSEPKKVGR	CRGSFPRFYDSETGKCTPFIYGGCGGNGNNFETLHACRAICRA-			
HMIQ7c7	-IQGNICSEPKKVGR	CRGSFPRFYDSETGKCTPFIYGGCGGNGNNFETLHACRAICRA-			
HMIQ7c6	-IQGNICSEPKKVGR	CRGSFPRSYDSETGKCTPFIYGGCGGNGNNFETLHACRAICRA-			
HCGS1.19	---GSICLEPKKVGR	CRGSFPRFYDSETGKCTPFIYGGCGGNGNNFETLHACRAICRA-			
SHPI-1	----SICSEPKKVGR	CKGYFPRFYDSETGKCTPFIYGGCGGNGNNFETLHACRAICRA-			
HCGS1.44	---GSICLEPKVVG	PCKARIRRFYDPETGCKPFIYGGCKGNGNNFETLHACRAICRA-			
HCGS1.20	---GSICLEPKVVG	PCKARIRRFYDSETGKCTPFIYGGCGGNGNNFETLHACRAICRA-			
HCGS1.11	---GSICLEPKVVG	PCKARIRRFYDSETGKCTPFIYGGCGGNGNNFETLHACRAICRA-			
HCRG1	---RGICSEPKVVG	PKAGLRRFYDSETGECKPFIYGGCKGNGNNFETLHACRAICRA-			
APHC1	---GSICLEPKVVG	PCTAYFRRFYDSETGKCTVFIYGGCEGNGNNFETLHACRAICRA-			
APHC2	---GSICLEPKVVG	PCTAYFRRFYDSETGKCTPFIYGGCEGNGNNFETLHACRAICRA-			
APHC3	---GSICLEPKVVG	PCTAYFRRFYDSETGKCTPFIYGGCEGNGNNFETLHACRAICRA-			
HCRG21	---RGICSEPKVVG	PCTAYFRRFYDSETGKCTPFIYGGCEGNGNNFETLHACRAICRA-			
HCGS1.36	---GSICLEPKVVG	PCTAYFRRFYDSETGKCTPFIHGGCEGNGNNFETLHACRAICRA-			
AsKC2	--INKDLLPMDVGR	CRARHPRYYNSSSRRCEKFIYGGCRGNANNFITKKECEKVGVR			
Txln1	KDRPDFCELPA	DTPGCRVRFPSFYYPNDEKKCLEFIYGGCEGNANNFITKKECESTCAA-			
DTX-B	--RBYACELIVA	AGPDMFFISAFYYSGKANKCYPTIYSGCRGNANRFETIEECRRTCVV-			
DTX-I	QPLRLKLCILHR	NPRGICYQKIPAFYYNQKKQCEGTWSGCGGNSNRFEITIEECRRTCIRK			
DTX-E	LQHRTFCKLPA	EFGPKASIPAFYYNWAACKCOLFHYGGCKGNANRFETIECKRHACVGV-			
BPTI	--RPDFCLEPPYT	GPCKARMIRYFYNAKAGLCQPFVYGGCRAKRNNEKSSDGMRTGGGA			
	*****	*****			
	P1P1				

Идентичные и консервативные остатки показаны на темно- и светло-сером фоне соответственно

Рисунок 23 – Множественное выравнивание АП пептидов Кунитц-типа

В отличие от GS-пептидов IQ-пептиды характеризуются слабым аминокислотным полиморфизмом. Основные замены в изоформах IQ-пептидов локализуются в области сайтов связывания с протеазами, преимущественно сайта слабых взаимодействий. Показано, что аминокислотные остатки этого сайта создают дополнительные электростатические взаимодействия, а также водородные связи с протеазой, стабилизируя фермент-ингибиторный комплекс [29]. В сайте слабых взаимодействий обнаружены замены Ile35 на Thr (HClQ4c8) или Leu (HClQ6c2), Cys39 на Arg (HClQ4c8), а также Gly40 на Glu (HClQ6c10, HClQ1c7) или Lys (HClQ6c2, HClQ6c9 и HClQ6c23) (рисунок 23). Стоит отметить, что большинство изоформ IQ-пептидов в позиции 40 содержат Gly, и лишь в отдельных изоформах присутствуют остатки Glu или Lys, которые, в свою очередь, преобладают среди изоформ HCGS-пептидов. Замена Gly41Glu вблизи сайта слабых взаимодействий наблюдается у изоформы HClQ5c2. Интересно, что в изоформах HClQ6c6 и HClQ6c10 (HMIQ7c3) обнаружена замена His50Arg, а в случае HClQ6c10 еще и замена Gly40Glu, характерные для APHC1-APHC3 [30,31] и HCRG21 [33] пептидов, модуляторов TRPV1 канала, а также HCGS1.36, ингибирующего трипсин и гистамин-индуцированное высвобождение ионов Ca^{2+} *in vitro* [149]. Замены Lys30Glu, Thr32Lys, Gly40Lys и Gly43Lys в изоформе HClQ6c9 характерны для HCRG1, который ингибирует трипсин и является блокатором K_v каналов [156]. Остатки Arg50 и Arg51 усиливают положительный заряд в С-концевом фрагменте HMIQ3c1, подобно Lys48 и Lys49 в AsKC2 из *A. viridis*, ингибитору трипсина и блокатору $K_v1.2$ [51] (рисунок 23). Примечательно, что пептиды Кунитц-типа змей, такие как Txln 1, являющийся мощным ингибитором плазмينا, и дендротоксины, которые являются блокаторами K_v каналов и слабыми ингибиторами трипсина, отличаются наличием отрицательно заряженных остатков в данных позициях (рисунок 24). В уникальных для *H. magnifica* изоформах HMIQ7c6 и HMIQ7c7 наблюдаются замены Phe23Ser и Lys10Glu соответственно (рисунок 34). В последовательностях HClQ1c5 и HClQ4c8 обнаружены замены Cys39Arg. Подобные замены остатков Cys также описаны для пептидов Кунитц-типа пауков [27], скорпионов [9], конусов [6] и лягушек [7]. Примечательно, что замены Cys в последовательностях HCGS-пептидов не найдены [11].

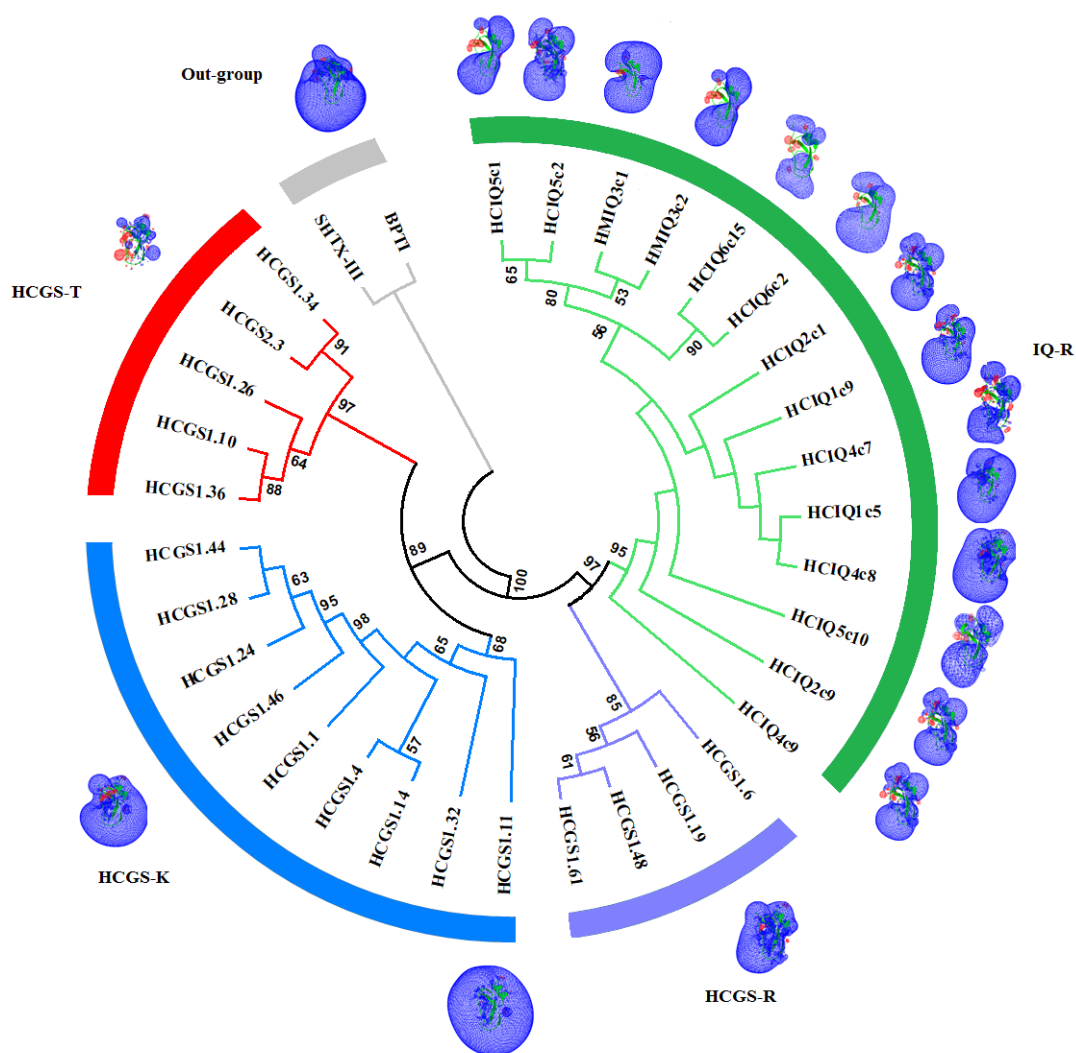
Таким образом, сравнение АП IQ-пептидов с HCGS-пептидами позволило выявить основные различия между ними. Появление последовательности, кодирующей пропептид с сайтом расщепления Lys-Arg, характерным для нейротоксинов и актинопоринов актиний, может указывать на рекруитмент IQ-пептидов в состав ядовитого секрета в качестве токсинов. Показано, что АП IQ-пептидов характеризуются слабым полиморфизмом по сравнению с HCGS-пептидами. Изоформы IQ-пептидов различаются между собой

представленностью и величиной молекулярного заряда. Наличие в АП сайтов связывания с протеазами и присутствие сходных аминокислотных замен с другими пептидами Кунитц-типа позволяет предположить проявление ими трипсинингибирующей активности, а также способность взаимодействовать с другими протеазами и/или каналами.

2.1.4 Филогенетический анализ и электростатический потенциал IQ-пептидов

Для установления эволюционных взаимоотношений между IQ- и GS-пептидами был проведен филогенетический анализ НП их предшественников. Известно, что НП содержат как несинонимичные, так и синонимичные замены. Поэтому с точки зрения эволюционных событий НП могут быть более информативны, чем АП. Для построения филогенетического дерева был использован метод ближайших соседей (Neighbor-Joining, NJ). В анализ были взяты НП, кодирующие 14 изоформ IQ-пептидов, четыре изоформы HCGS-R, пять изоформ HCGS-T и девять изоформ HCGS-K [46]. В качестве внешней группы были использованы последовательности, кодирующие BPTI (NM_001001554) из *B. taurus* и SHTXIII (AB362569) из *S. haddoni* (рисунок 24). Анализ полученного дерева показал, что гены IQ- и GS-пептидов имеют общее монофилетическое происхождение. Разделение на кластеры четко коррелирует с полиморфизмом остатка в P1-положении реактивного сайта: первый кластер включает гены пептидов, для которых характерно наличие Arg в этом положении, тогда как второй кластер объединяет гены, кодирующие пептиды с Lys (HCGS-K) и Thr (HCGS-T) (рисунок 24).

Гены IQ-пептидов образуют отдельную группу IQ-R, в основании которой располагается транскрипт *HCIQ4c9*, не содержащий пропептид-кодирующей последовательности, подобно транскриптам HCGS-пептидов. Эти данные подтверждают высказанное нами предположение о том, что *HCIQ4c9* является переходной формой от предкового гена HCGS-пептида, у которого отсутствует пропептид, к генам HCIQ-пептидов. Мы полагаем, что в процессе генной дупликации, рекомбинации и фиксации адаптивных полиморфизмов происходило формирование подсемейства генов IQ-пептидов. Появление второго интрона и пропептид-кодирующего участка может свидетельствовать о рекруитменте продуктов этих генов в состав ядра и возможном приобретении ими новой функции. Существование транскриптов IQ-пептидов в тканях щупалец *H. crista* и *H. magnifica* и одинаковая организация кодирующих их генов может свидетельствовать о появлении подсемейства генов IQ-пептидов до разделения этих видов.

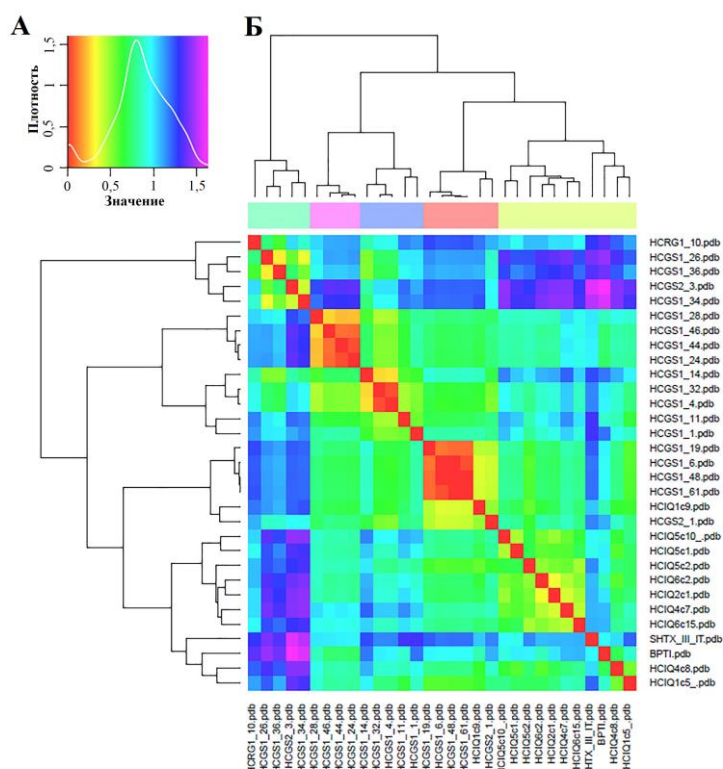


Синим цветом на эквипотенциальных поверхностях показан положительный потенциал, красным цветом – отрицательный потенциал

Рисунок 24 – Филогенетическое дерево и эквипотенциальные поверхности IQ- и HCGS-пептидов

Для понимания того, как адаптивная эволюция влияет на функциональную специализацию IQ-пептидов *H. crista* и *H. magnifica*, была проведена кластеризация IQ- и HCGS-пептидов на основании расчета их молекулярных эквипотенциальных поверхностей. Для этого были построены пространственные модели зрелых пептидов и рассчитаны их молекулярные электростатические потенциалы (МЭП), которые являются важной характеристикой при определении специфичности и кинетики связывания молекулы с мишенью [181]. Необходимо отметить, что появление двух дополнительных остатков на N-конце IQ-пептидов незначительно влияет на распределение заряда. Эквипотенциальные поверхности большинства IQ-пептидов были близки таковой наиболее представленной изоформы – HClQ2c1 (рисунок 24). Согласно кластеризации IQ- и GS-пептидов, основанной на их электростатических свойствах (рисунок 25), пептиды попадают в те же кластеры, что и при филогенетическом анализе. IQ-пептиды, за исключением HClQ4c8, HClQ1c5, HClQ1c9 и

HMIQ3c1, образуют отдельную группу. Пептиды HClQ4c8, HClQ1c5 и HMIQ3c1 попадают в кластер с BPTI, тогда как HClQ1c9 – в кластер HCGS-R.



А – тепловая карта, где красным и оранжевым цветами показаны аналогичные потенциалы, а синим – пептиды с более удаленными МЭП. Б – дерево, на котором пептиды сгруппированы в соответствии с подобием МЭП

Рисунок 25 – Кластеризация HClQ- и HCGS-пептидов согласно их МЭП

Несмотря на высокую гомологию между АП IQ- и GS-пептидов, их эквипотенциальные поверхности различаются, что может влиять на связывание с протеазами или взаимодействие с новыми мишенями. Большинство IQ-пептидов имеет большой положительный заряд в области протеаза-связывающей петли, характерный для сильных ингибиторов сериновых протеаз Кунитц-типа [104,157]. Появление отрицательного заряда в этой области у HClQ4c7 вследствие замены Gly17Glu может привести к снижению ингибирующей активности. С другой стороны, замена Gly17Arg в HClQ1c9 ведет к увеличению положительного заряда в области протеаза-связывающей петли за счет взаимного отталкивания боковых цепей положительно заряженных остатков Arg в положениях P1 и P1', что также может привести к снижению ингибирующей активности пептида. Кроме того, увеличение положительного заряда пептидов HClQ4c8 и HClQ1c5 вследствие замены остатков Cys31Arg и Cys39Arg, соответственно, сближает эти пептиды с BPTI.

Таким образом, монофилетическое происхождение IQ- и HCGS-генов, высокая идентичность первого интрона и наличие структурного варианта предшественника без пропептида подтверждают принадлежность генов IQ-пептидов к мультигенному GS-семейству. В процессе генной дупликации, приобретения второго интрона и пропептидирующей последовательности гены IQ-пептидов выделились в отдельное подсемейство в составе GS-семейства. Существование ортологов IQ-пептидов в геномах *H. crispa* и *H. magnifica* свидетельствует о появлении IQ-подсемейства до видовой дивергенции. Изменения электростатических свойств отдельных IQ-пептидов могут влиять на связывание пептидов с протеазами или способствовать взаимодействию с новыми мишенями.

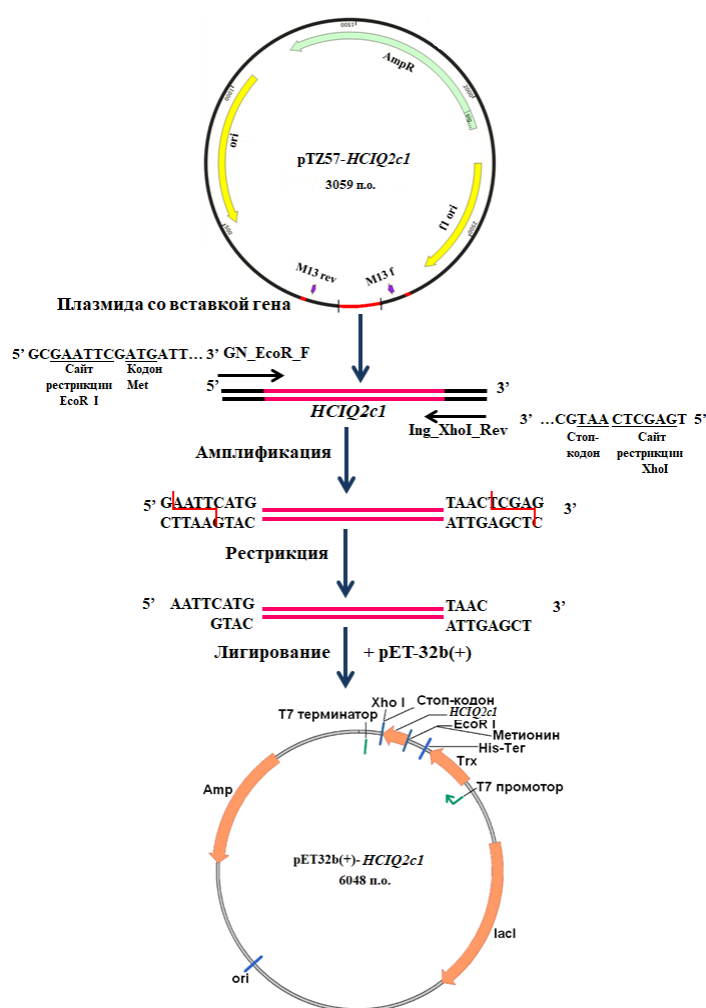
2.2 Получение и изучение пространственной организации рекомбинантных аналогов IQ-пептидов

2.2.1 Экспрессия и выделение рекомбинантных аналогов IQ-пептидов

Для получения рекомбинантных IQ-пептидов *H. crispa* и *H. magnifica* с целью исследования их биологической активности и определения возможного фармакологического потенциала были выбраны HClQ2c1 (как наиболее представленная изоформа) и изоформы с уникальными заменами HClQ1c9 (Gly17Arg), HClQ4c7 (Gly17Glu) и HMIQ3c1 (His50Arg и Ala51Arg). Несмотря на важность выделения нативных пептидов из экстрактов морских анемонов, получение рекомбинантных аналогов имеет ряд преимуществ, особенно в отношении минорных изоформ. Следует отметить, что для идентификации и клонирования в экспрессионный вектор целевой последовательности не требуется большого количества биоматериала, что способствует сохранению популяций морских анемонов в природе. Выделение рекомбинантных пептидов, как правило, проходит в 2-3 стадии, что значительно сокращает времязатраты, а также позволяет получать высокоочищенный пептид в достаточных количествах. Несмотря на разнообразие методов получения целевых пептидов [122,126,182–187], гетерологическая экспрессия рекомбинантных генов в бактериальной системе остается одним из самых широко распространенных и экономически оправданных методов.

Для создания генно-инженерных конструкций был использован экспрессионный вектор pET32b(+). Выбор данного вектора связан с присутствием в нем гена тиоредоксина (Trx), который обеспечивает замыкание дисульфидных связей в целевом пептиде и сохранение его в растворимой форме [188]. В АП IQ-пептидов содержится шесть остатков Cys, которые образуют три дисульфидные связи. Между Trx и целевым пептидом в гибридном белке также присутствует последовательность из шести остатков His, необходимая для выделения гибридного белка из клеточного лизата с помощью металл-аффинной хроматографии. Кроме того, в начало последовательности целевого пептида был введен остаток Met для эффективного отщепления остатков His от гибридного белка бромцианом [189].

Последовательности генов, кодирующие зрелый пептид, были амплифицированы с помощью ген-специфичных праймеров (GN_EcoRI_F и Inh_XhoI_Rev). В качестве матрицы в реакции были использованы рекомбинантные плазмиды на основе вектора pTZ57R/T со вставками соответствующих транскриптов генов *HCIQ* и *HMIQ*. Полученные ПЦР-фрагменты, содержащие сайт рестрикции *EcoRI* и кодон для Met на 5'-конце, а также сайт для *XhoI* и стоп-кодон TAA на 3'-конце, были обработаны соответствующими эндонуклеазами и субклонированы в экспрессионный вектор pET32b(+) по указанным сайтам рестрикции под T7-контролируемый промотор (рисунок 26). Рекомбинантные пептиды были получены в бактериальной системе *Escherichia coli* штамма BL21 (DE3) в составе гибридного белка с Trx.



HCIQ2c1 кодирует зрелый пептид, AmpR – β-лактамазу, Trx – тиоредоксин, His-тег – полигистидиновую последовательность; M13_rev, M13_f – универсальные праймеры; *XhoI* и *EcoRI* – сайты рестрикции.

Стрелками показаны праймеры, двойными розовыми линиями – амплифицированные фрагменты *HCIQ2c1*

Рисунок 26 – Схема получения экспрессионной конструкции на примере *HCIQ2c1*

Условия проведения экспрессии генов были подобраны экспериментально. Установлено, что наибольший выход гибридных белков наблюдался в присутствии индуктора ИПТГ в концентрациях 0,2–0,5 мМ при температуре +37 °С в течение трех часов. Уровень продукции гибридных белков в среднем составил более 100 мг на литр клеточной культуры. После разрушения клеток ультразвуком гибридные белки были выделены с помощью металл-аффинной хроматографии. Молекулярная масса гибридных белков составила 23 кДа, что соответствует расчетной массе. После расщепления гибридного белка бромцианом в кислой среде (рН 1–2) рекомбинантные IQ-пептиды были очищены методом ОФ ВЭЖХ. Согласно полученным профилям элюции, время удерживания целевых пептидов составило от 27,3 до 35,5 мин (рисунок 27). Целевые пептиды содержались, главным образом, во фракциях, соответствующих основным пикам, что может указывать на корректное формирование Кунитц-фолда. Средний выход целевых пептидов составил от 8 до 13 мг на литр клеточной культуры (таблица 2).

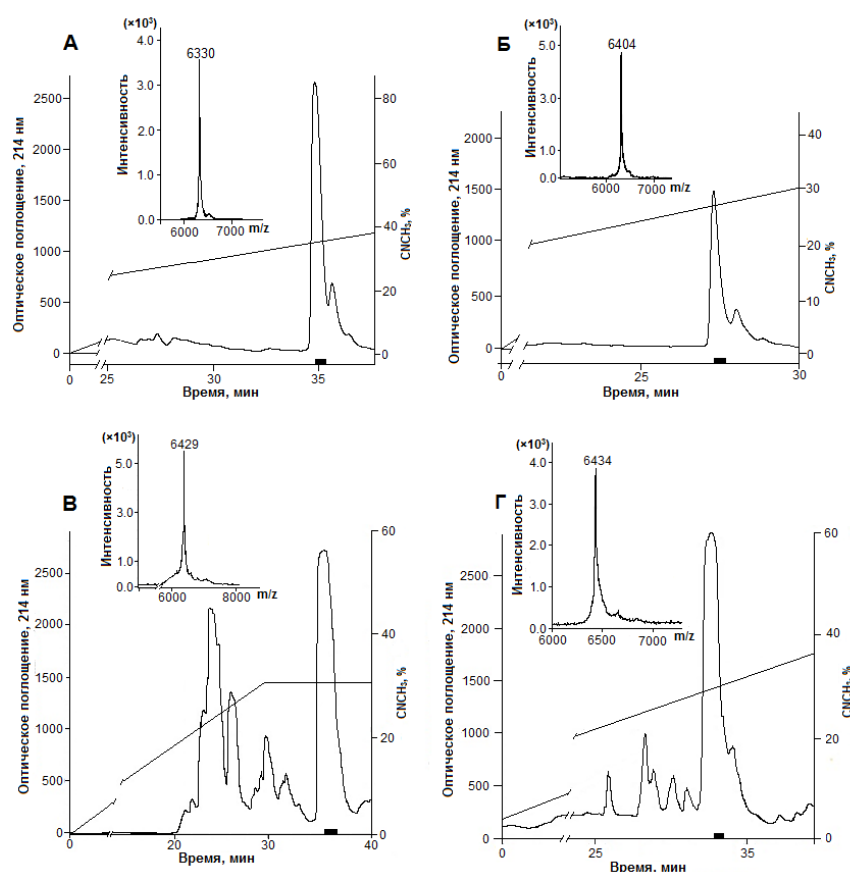


Рисунок 27 – Профили элюции ОФ ВЭЖХ и МАЛДИ-ВП масс-спектры рекомбинантных пептидов HSIQ2c1 (А), HSIQ4c7 (Б), HSIQ1c9 (В) и HMIQ3c1 (Г)

Таблица 2 – Выход гибридного и рекомбинантного белков

Пептид	Масса гибридного белка с 1 л клеточной культуры, мг	Масса рекомбинантного пептида с 1 л клеточной культуры, мг
НСIQ2c1	175,13	9,89
НСIQ1c9	191,60	9,02
НСIQ4c7	191,60	13,05
НМИQ3c1	117,50	7,90

Согласно результатам МАЛДИ-ВП-МС, молекулярная масса пептидов составила 6330 Да для НСИQ2c1, 6404 Да для НСИQ4c7, 6429 Да для НСИQ1c9 и 6434 Да для НМИQ3c1, что соответствует расчётным данным. Определение N-концевых аминокислотных остатков пептидов (первые 15 а.о.) методом автоматической деградации по Эдману подтвердило их соответствие выведенным последовательностям.

Для подтверждения корректности пространственной укладки IQ-пептидов был использован метод одномерной ^1H ЯМР-спектроскопии. Полученные ЯМР-спектры характеризовались значительной дисперсией химических сдвигов NH-протонов, узкими линиями и большим сдвигом сигналов некоторых алифатических протонов в область сильного поля (рисунок 28). Наличие сигналов в отрицательной области свидетельствовало о значительной дисперсии химических сдвигов сигналов NH-протонов, что указывает на формирование пространственной структуры пептидов. Узкие линии сигналов ЯМР-спектра позволяют говорить о стабильности структуры, а одинаковая ширина линий – о гомогенности пептида. Большой сдвиг сигналов протонов некоторых алифатических боковых цепей в область сильного поля свидетельствует об их пространственной сближенности с ароматическими остатками, что часто наблюдается в β -структурированных белках. На основании этого был сделан вывод, что рекомбинантные аналоги пептидов НСИQ2c1, НСИQ4c7, НСИQ1c9 и НМИQ3c1 обладают выраженной пространственной структурой, сформированной в результате корректного фолдинга, что дает основание для изучения их биологической активности.

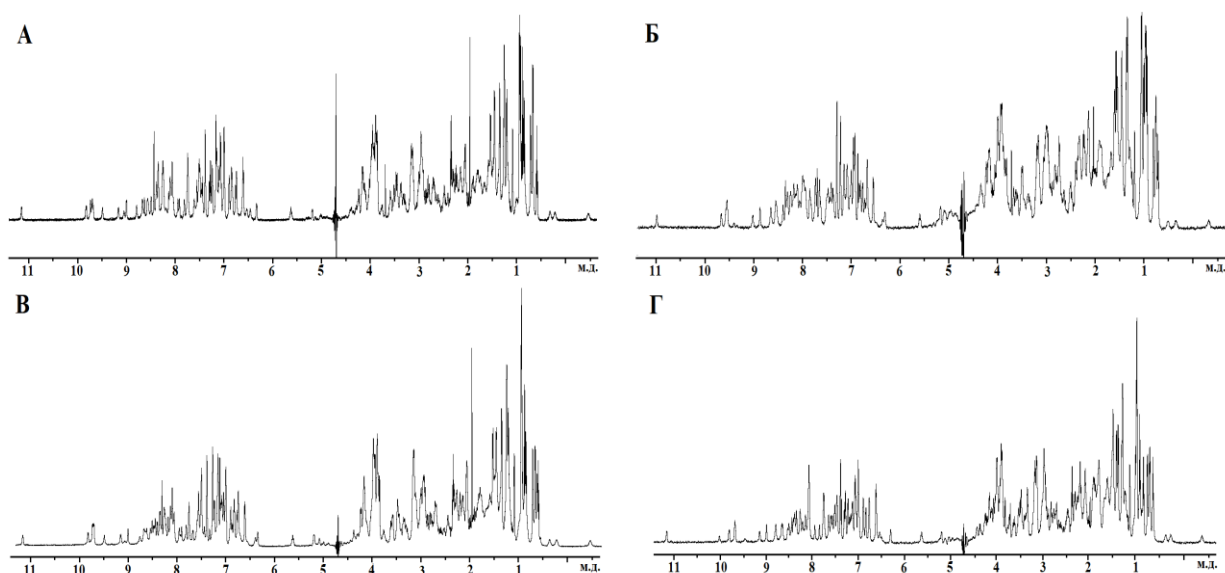
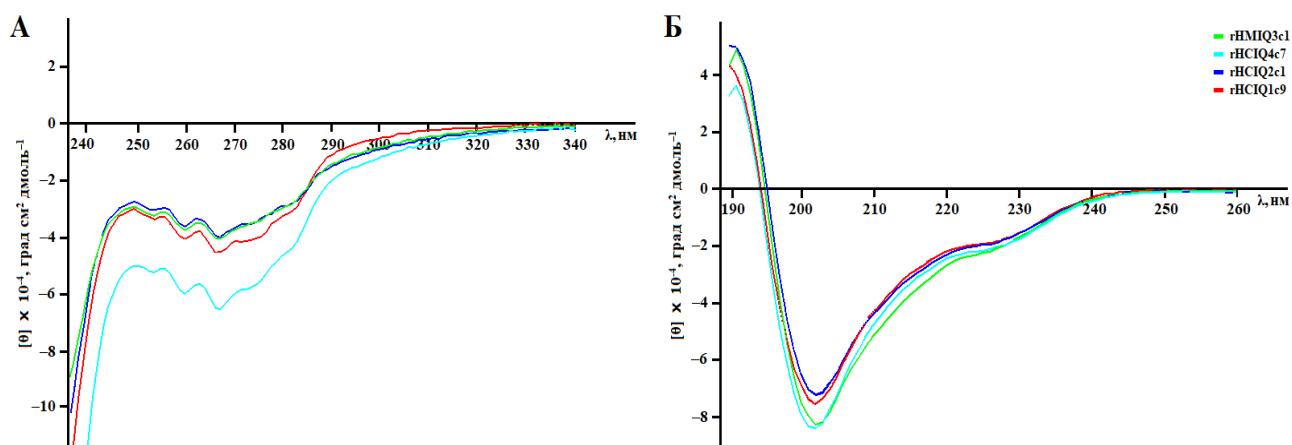


Рисунок 28 – Одномерные ^1H ЯМР-спектры пептидов НСИQ2с1 (А), НСИQ4с7 (Б), НСИQ1с9 (В) и НМИQ3с1 (Г)

2.2.2 Изучение пространственной организации IQ-пептидов методом КД-спектроскопии

2.2.2.1 Расчет элементов вторичной структуры IQ-пептидов

Вторичная структура рекомбинантных пептидов была проанализирована с помощью спектроскопии кругового дихроизма (КД). Спектры КД были получены в ближней (240-310 нм) и дальней (190-240 нм) УФ-областях. Ближняя УФ-область является областью поглощения ароматических остатков (Phe, Tyr) и дисульфидных связей, тогда как дальняя УФ-область является областью поглощения пептидных связей и характеризует вторичную структуру пептидов и белков. Согласно рисунку 29, А спектры КД IQ-пептидов при 25 °С в ближней УФ-области (240-310 нм) имеют схожую выраженную тонкую структуру с отрицательными полосами при 269 и 260 нм, которые относятся к остаткам Phe, и полосы низкой эллиптичности при 275 и 282 нм, соответствующие остаткам Tyr. Сравнение АП IQ-пептидов показало, что они содержат одни и те же ароматические остатки в идентичных позициях. В спектрах пептидов имеются отрицательные полосы при 237 нм, эллиптичность которых выше, чем у полос, принадлежащих остаткам Tyr и Phe. Предполагается, что данные полосы соответствуют дисульфидным связям. Тонкая структура КД-спектров указывает на асимметрию окружения ароматических остатков и их жесткую фиксацию в молекуле, что может свидетельствовать о наличии выраженной вторичной структуры и стабильной конформации пептидов.



Синей линией показан HCIQ2c1, красной – HCIQ1c9, голубой – HCIQ4c7 и зеленой – HMIQ3c1

Рисунок 29 – Спектры КД IQ-пептидов в деионизированной воде в ближней (А) и дальней (Б) УФ-областях

Спектры КД IQ-пептидов в дальней УФ-области (190–240 нм) характеризуются минимумом при 202 нм и максимумом при 193 нм (рисунок 29, Б). В таблице 3 приведены рассчитанные значения элементов вторичной структуры IQ-пептидов. В структуре пептида HCIQ1c9 наблюдается увеличение доли α -спиралей и снижение β -структуры, тогда как для остальных пептидов характерно примерно равное их содержание. Подобное распределение структурных элементов указывает на то, что IQ-пептиды относятся к смешанному ($\alpha + \beta$)-типу структурной организации.

Таблица 3 – Содержание элементов вторичной структуры IQ-пептидов и ShPI-1

Пептид	α -Спираль*			β -Структура*			β -Изгиб	Неупорядоченная структура
	I	II	III	I	II	III		
HCIQ2c1	7,1	13,9	21,0	17,4	6,9	24,3	19,0	35,7
HCIQ4c7	7,1	13,9	21,0	17,4	6,9	24,3	18,9	35,5
HCIQ1c9	10,6	16,2	26,8	14,2	5,7	19,9	19,3	34,0
HMIQ3c1	7,1	13,9	21,0	17,5	7,0	24,5	19,0	35,5
ShPI-1**	—	—	20,0	—	—	21,8	18,2	40,0
*I – регулярная структура, II – искаженная структура, III – общая структура. **Данные КД по алгоритму CDSSTR.								

Значения элементов вторичной структуры IQ-пептидов сопоставимы с данными, полученными ранее для ShPI-1 (таблица 3), что также свидетельствует о формировании пространственной структуры Кунитц-типа. Согласно данным ЯМР-спектроскопии, в ShPI-1

аминокислотные остатки в позициях 16-33 образуют антипараллельный β -стренд, в позициях 46-52 формируют α -спираль на С-конце и в позициях 1-4 – 3_{10} -спираль на N-конце молекулы [12]. Сравнение АП IQ-пептидов и SHPI-1 показало, что последовательности вышеперечисленных участков IQ-пептидов практически идентичны (рисунок 30), что указывает на формирование одинаковых элементов вторичной структуры.

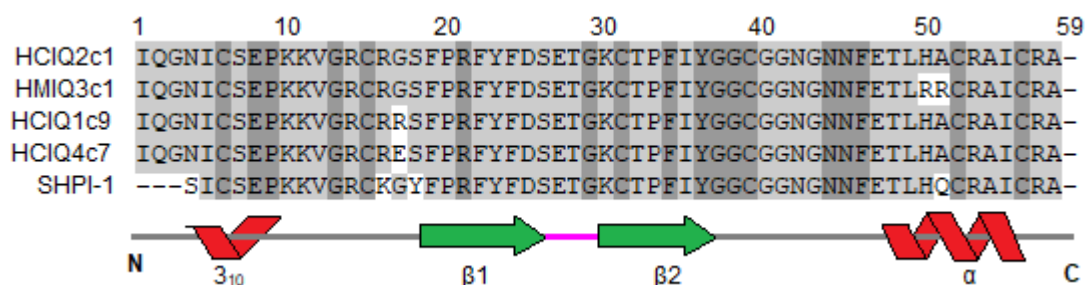
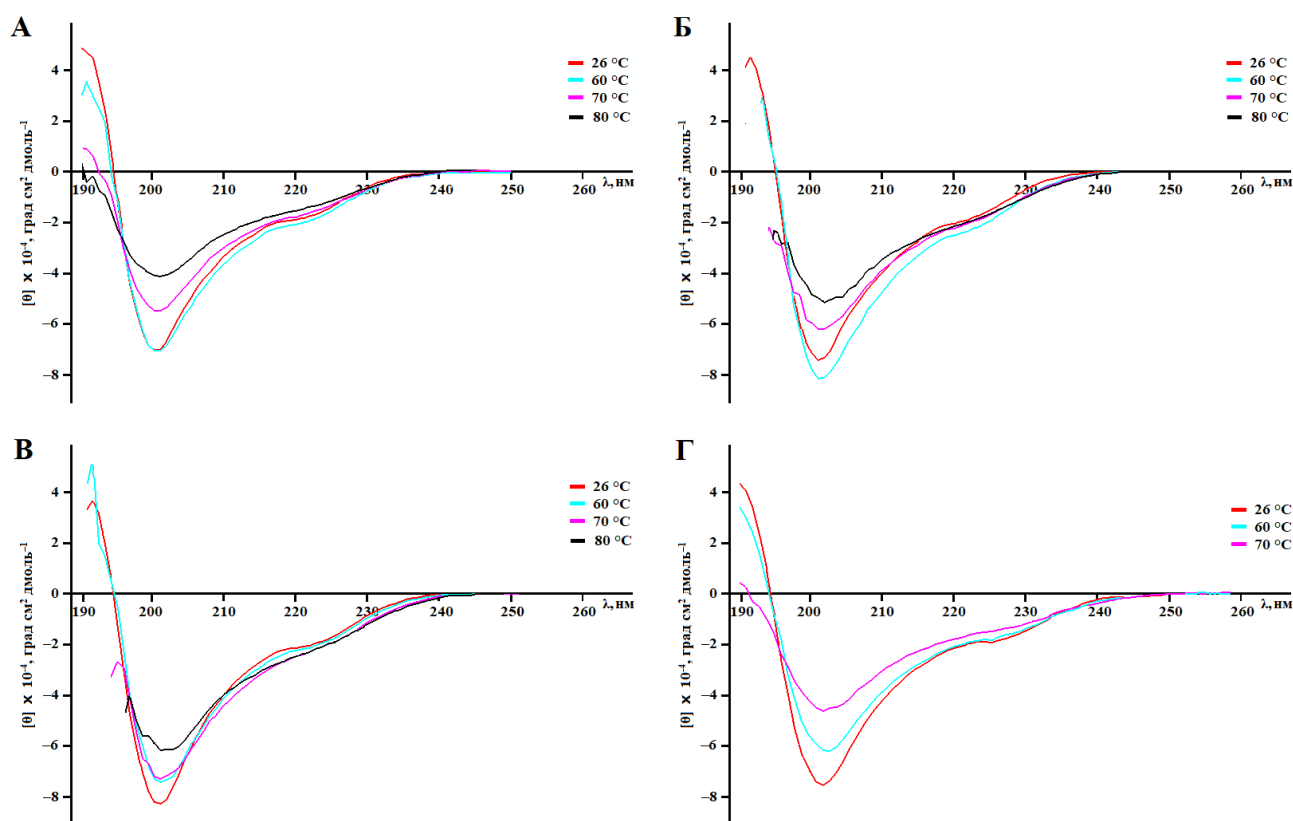


Рисунок 30 – Множественное выравнивание IQ-пептидов и SHPI-1 (Uniprot P31713) и схематическое изображение элементов вторичной структуры SHPI-1

2.2.2.2 Влияние температуры на пространственную организацию IQ-пептидов

Влияние температуры на пространственную организацию рекомбинантных IQ-пептидов было изучено методом КД-спектроскопии. Согласно спектрам КД в области поглощения пептидной связи, нагревание растворов HClQ2c1, HMIQ3c1 и HClQ4c7 до 70 °C не приводило к конформационным изменениям молекул на уровне вторичной структуры (рисунок 31). При дальнейшем повышении температуры до 80 °C наблюдалось снижение эллиптичности отрицательной полосы в области 200 нм и сглаживание плеча в области 225-230 нм, что свидетельствует о конформационном переходе. Схожее значение температуры конформационного перехода наблюдалось для пептида Кунитц-типа *H. crispata* InhVJ [190]. В случае HClQ1c9 при повышении температуры раствора до 60 °C конформация пептида оставалась стабильной на уровне вторичной структуры, но при дальнейшем увеличении температуры на 10 °C наблюдался конформационный переход. При нагревании растворов пептидов выше 80 °C спектры КД изменялись незначительно, поскольку все молекулы уже находились в денатурированном состоянии.



А – HClQ2c1, Б – HMIQ3c1, В – HClQ4c7, Г – HClQ1c9

Рисунок 31 – Спектры КД IQ-пептидов в деионизированной воде в дальней УФ-области

Таким образом, в бактериальной системе *E. coli* штамма BL21 (DE3) было получено четыре рекомбинантных аналога IQ-пептидов. Проведен подбор условий экспрессии и выделения целевых пептидов. Методами одномерной ^1H ЯМР-спектроскопии и КД-спектроскопии установлено, что все рекомбинантные IQ-пептиды обладают выраженной пространственной структурой, сформированной в результате корректного фолдинга, с практически одинаковым содержанием элементов вторичной структуры. Показано, что IQ-пептиды обладают высокой термостабильностью, сохраняя конформацию молекулы на уровне вторичной структуры при температуре до 70 °C.

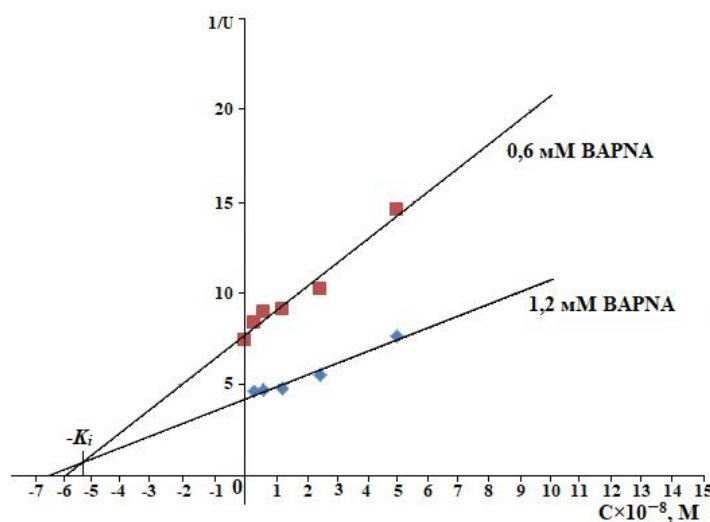
2.3 Изучение биологической активности IQ-пептидов

Согласно литературным данным, основной мишенью действия пептидов Кунитц-типа являются сериновые протеазы, в частности, трипсин и α -химотрипсин [1]. Отдельные представители этой группы способны ингибировать цистеиновые протеазы [191], аспарагиновые протеазы [53] и металлопротеиназы [192], а также блокировать K_v [51,53,156] и модулировать TRPV1 [30,31] каналы. Кроме того, некоторые пептиды Кунитц-типа комбинаторной библиотеки *H. crispata* подавляют гистамин-индуцированное увеличение концентрации ионов кальция в макрофагах, ингибируют синтез некоторых провоспалительных

медиаторов [148,149] и проявляют анальгетическую [30,160,193] и противовоспалительную активность [156]. С целью выяснения фармакологического потенциала IQ-пептидов была изучена их биологическая активность.

2.5.1 Определение констант ингибирования трипсина IQ-пептидами

Константы ингибирования (K_i) трипсина IQ-пептидами были определены по методу Диксона, который представляет собой графический способ определения как типа ингибирования, так и расчета константы (K_i) [194]. В качестве субстрата был использован р-нитроанилид N-бензоил-D,L-аргинина (BAPNA). Согласно рисунку 32, IQ-пептиды имеют смешанный тип ингибирования трипсина.



U —показатель оптического поглощения реакционной смеси при длине волны 410 нм; C — концентрация HClQ2c1

Рисунок 32 – Графическое определение константы ингибирования трипсина IQ-пептидами по методу Диксона [194] на примере HClQ2c1

Значения K_i трипсина пептидами HClQ2c1 и HMIQ3c1 оказались близки значениям K_i HCGS- и HCRG-пептидов с Arg и Lys в P1-положении, в то время как значения K_i пептидов HClQ4c7 и HClQ1c9 находились в диапазоне значений, соответствующих пептидам с Thr в P1-положении (таблица 4). Несмотря на высокую степень идентичности АП IQ-пептидов и SHPI-1 (91-93%), значение K_i трипсина SHPI-1 оказалось ниже на 2–3 порядка, что, вероятно, связано с различиями в сайте сильных взаимодействий пептидов с протеазами, включая положение P1.

Таблица 4 – Константы ингибирования трипсина для пептидов Кунитц-типа актиний

Вид актинии	Пептид	Сайт сильных взаимодействий (положения 11-19)	K_i трипсина, М	Ссылка
<i>H. crista</i>	HClQ4c7	KVGRC R ESF	$1,9 \times 10^{-7}$	
	HClQ2c1	KVGRC R GSF	$5,2 \times 10^{-8}$	
	HClQ1c9	KVGRC R RSF	$6,3 \times 10^{-7}$	

	HCGS1.19	KVGRC R GSF	$3,0 \times 10^{-8}$	[149]
<i>H. magnifica</i>	HMIQ3c1	KVGRC R GSF	$5,0 \times 10^{-8}$	
	APHC1	VVGPC T AYF	$1,0 \times 10^{-6}$	[30]
	HCGS1.36	VVGPC T AYF	$1,0 \times 10^{-7}$	[149]
	HCRG21	VVGPC T AYF	$2,0 \times 10^{-7}$	[33]
<i>H. crispa</i>	HCGS1.10	VVGPC T AYL	$2,1 \times 10^{-7}$	[149]
	APHC3	VVGPC T AYF	$5,0 \times 10^{-7}$	[31]
	APHC2	VVGPC T AYF	$9,0 \times 10^{-7}$	[31]
	InhVJ	VVGPC T AYF	$7,38 \times 10^{-8}$	[29]
	HCRG1	VVGPC K AGL	$2,8 \times 10^{-8}$	[124]
<i>H. crispa</i>	HCRG2	VVGPC K ARI	$5,0 \times 10^{-8}$	[124]
	HCGS1.20	VVGPC K ARI	$2,1 \times 10^{-8}$	[148]
<i>S. helianthus</i>	SHPI-1	KVGRC K GYF	$1,1 \times 10^{-10}$	[53]

Известно, что высокая ингибирующая активность пептидов Кунитц-типа связана с большим положительным зарядом в области протеаза-связывающей петли, в связи с чем появление отрицательного заряда в этой области может способствовать снижению энергии ассоциации комплекса с ферментом [25]. Действительно, замена Gly17Glu в АП HClQ4c7 приводит к увеличению K_i на порядок по сравнению с таковой HClQ2c1 (таблица 4). С другой стороны, замена Gly17Arg в HClQ1c9 также способствовала снижению трипсинингибирующей активности пептида. Показано, что замена Gly на Arg в P1'-положении BPTI приводила к снижению константы ассоциации пептида на четыре порядка с трипсином и α -химотрипсином и на порядок с плазмином [25]. Мы полагаем, что замена нейтральных остатков Gly или Ala в этом положении у IQ-пептидов на остатки с более объемным заместителем препятствует образованию достаточно прочного фермент-ингибиторного комплекса, что приводит к снижению ингибирующей активности.

Таким образом, рекомбинантные аналоги IQ-пептидов являются ингибиторами трипсина, значения K_i которых находятся в диапазоне значений, характерных для других пептидов Кунитц-типа H. crispa.

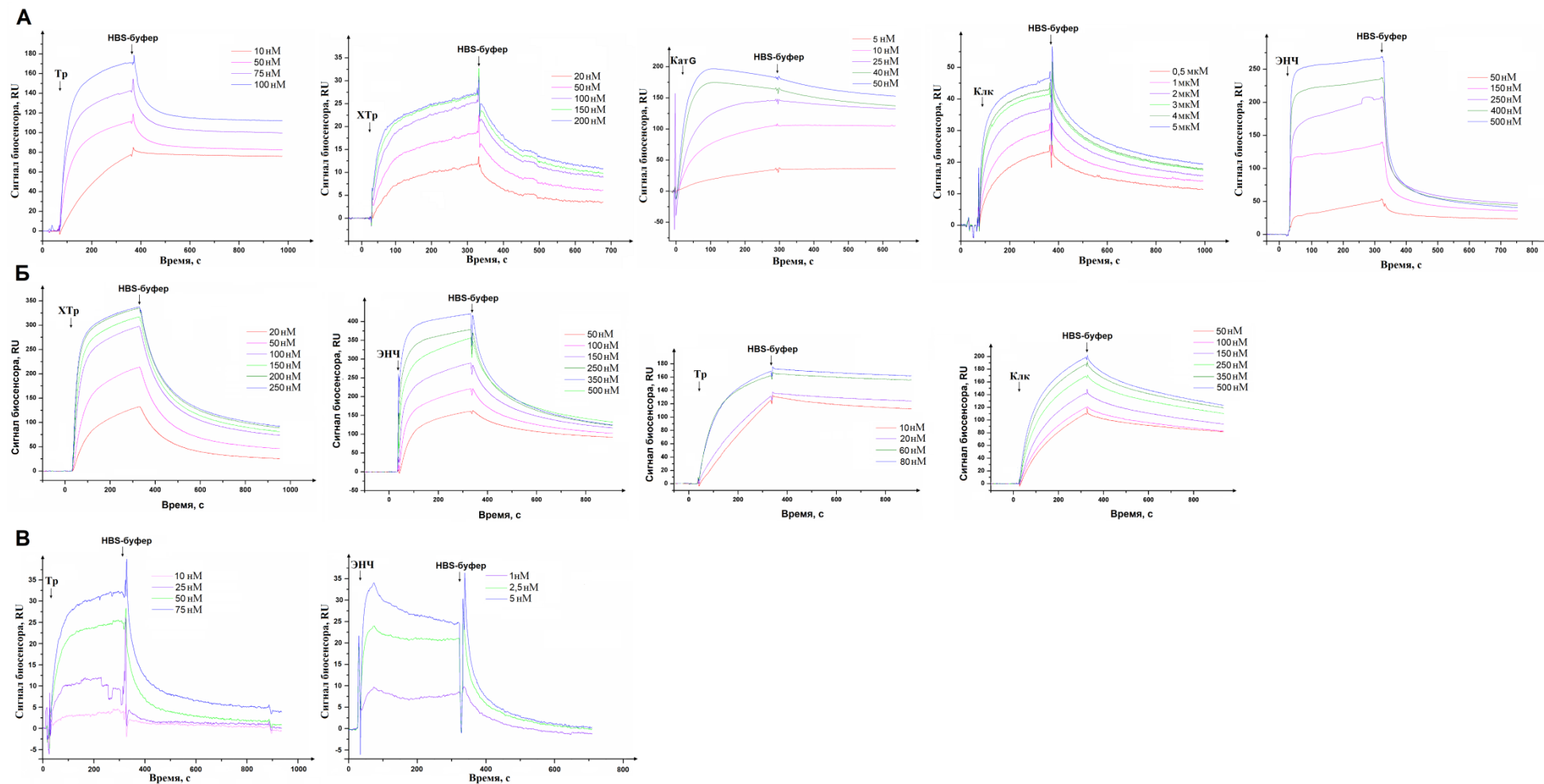
2.3.2 Исследование взаимодействия IQ-пептидов с сериновыми протеазами

Для установления специфичности взаимодействия IQ-пептидов с различными сериновыми протеазами был использован метод поверхностного плазмонного резонанса. Этот метод позволяет определить кинетические и термодинамические параметры образования комплексов и поэтому широко используется в химических и биологических сенсорах для установления различных типов взаимодействия [195].

Взаимодействие IQ-пептидов (HClQ2c1, HMIQ3c1 и HClQ4c7) с трипсином, α -химотрипсином, эластазой нейтрофилов человека (ЭНЧ), калликреином и катепсином G было изучено на оптическом биосенсоре Biacore 3000 в лаборатории межмолекулярных

взаимодействий ИБМХ РАН, г. Москва. IQ-пептиды были иммобилизованы на карбоксиметилированных подложках оптических чипов CM4. Ферменты, в концентрациях 0,01–10 мкМ, пропускали через измерительную кювету биосенсора, где наблюдали их взаимодействие с пептидами. В отличие от охарактеризованных ранее Кунитц-пептидов InhVJ [28], HCRG1 и HCRG2 [124], взаимодействующих только с трипсином и α -химотрипсином, HSIQ2c1 образовывал комплексы со всеми исследуемыми протеазами, HMIQ3c1 – с трипсином, α -химотрипсином, калликреином и ЭНЧ, тогда как HSIQ4c7 оказался более специфичным пептидом, взаимодействующим только с трипсином и ЭНЧ (рисунок 33).

Расчет кинетических констант скорости реакции ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d) IQ-пептидов с ферментами, а также констант ассоциации (K_A) и диссоциации (K_D) этих комплексов был проведен при температуре 25 °С. Полученные данные, представленные в таблице 5, указывают на образование достаточно прочных комплексов и исключают неспецифическое связывание. Снижение значений K_A HSIQ2c1 с ферментами наблюдалось в следующем порядке: трипсин > катепсин G > α -химотрипсин > ЭНЧ > калликреин. Величины K_D комплексов находились в диапазоне 10^{-10} – 10^{-7} М. Наиболее прочное связывание имели комплексы HSIQ2c1_{im}/трипсин и HSIQ2c1_{im}/катепсин G. Значения K_D для комплексов HSIQ2c1 с трипсином и α -химотрипсином отличались на порядок, что обусловлено величиной k_d . Для HMIQ3c1 константы ассоциации снижались в порядке: трипсин > калликреин > α -химотрипсин > ЭНЧ. Величина K_D для HMIQ3c1_{im}/трипсин ($K_D = 1,07 \times 10^{-9}$ М) оказалась на порядок выше, чем таковая для HSIQ2c1_{im}/трипсин ($K_D = 2,51 \times 10^{-10}$ М). Отсутствие взаимодействия HMIQ3c1 с катепсином G связано, вероятно, с заменой His50Arg и/или Ala51Arg. Несмотря на высокую идентичность с HSIQ2c1, пептид HSIQ4c7 не взаимодействовал с α -химотрипсином, калликреином и катепсином G, что может быть обусловлено заменой Gly17Glu в сайте сильных взаимодействий пептида с сериновыми протеазами. Полученные значения K_D комплексов IQ_{im}/трипсин четко коррелируют со значениями K_i трипсина для этих пептидов.



ХТр – α -химотрипсин, Тр – трипсин, Кат G – катепсин G, ЭНЧ – эластаза нейтрофилов человека и Клк – панкреатический калликреин; концентрации ферментов указаны справа в верхнем углу

Рисунок 33 – Сенсограммы взаимодействия сериновых протеаз с иммобилизованными HSIQ2c1 (А), HMIQ3c1 (Б) и HSIQ4c7 (В)

Таблица 5 – Кинетические параметры образования комплексов IQ-пептидов с сериновыми протеазами

Пептид	Фермент	k_a , 1/М×с	k_d , 1/с	K_A , М ⁻¹	K_D , М
НСIQ2с1	Трипсин	$2,05 \times 10^4$	$8,17 \times 10^{-3}$	$3,98 \times 10^9$	$2,51 \times 10^{-10}$
	Химотрипсин	$7,69 \times 10^4$	$7,49 \times 10^{-3}$	$1,03 \times 10^7$	$9,74 \times 10^{-8}$
	Калликреин	$4,94 \times 10^4$	$3,79 \times 10^{-3}$	$2,04 \times 10^6$	$4,9 \times 10^{-7}$
	Эластаза	$6,8 \times 10^4$	$8,61 \times 10^{-3}$	$7,9 \times 10^6$	$1,27 \times 10^{-7}$
	Катепсин G	$1,29 \times 10^6$	$3,59 \times 10^{-4}$	$3,58 \times 10^9$	$2,79 \times 10^{-10}$
НМИQ3с1	Трипсин	$1,42 \times 10^5$	$1,52 \times 10^{-4}$	$9,36 \times 10^8$	$1,07 \times 10^{-9}$
	Химотрипсин	$1,5 \times 10^4$	$7,07 \times 10^{-3}$	$2,13 \times 10^7$	$4,7 \times 10^{-8}$
	Калликреин	$2,56 \times 10^4$	$7,18 \times 10^{-4}$	$3,56 \times 10^7$	$2,81 \times 10^{-8}$
	Эластаза	$5,28 \times 10^4$	$5,85 \times 10^{-3}$	$9,03 \times 10^6$	$1,11 \times 10^{-7}$
	Катепсин G	–	–	–	–
НСIQ4с7	Трипсин	$2,25 \times 10^4$	$4,66 \times 10^{-3}$	$4,83 \times 10^6$	$2,07 \times 10^{-7}$
	Химотрипсин	–	–	–	–
	Калликреин	–	–	–	–
	Эластаза	$1,19 \times 10^4$	$1,14 \times 10^{-2}$	$1,05 \times 10^6$	$9,55 \times 10^{-7}$
	Катепсин G	–	–	–	–

Примечание – «–» – отсутствие связывания фермента с пептидом.

Все исследуемые IQ-пептиды взаимодействовали с ЭНЧ ($K_D \sim 10^{-7}$ М). Значения K_D комплексов IQ-пептидов с ЭНЧ оказались на 1–3 порядка выше таковых комплексов с трипсином. Однако, несмотря на более высокие значения констант, наблюдалось достаточно прочное взаимодействие IQ-пептидов с этим ферментом. Ранее методом молекулярного моделирования было показано взаимодействие гомолога Jn-IV из *H. crista* с ЭНЧ [196]. Согласно полученным данным, взаимодействие Jn-IV с ЭНЧ происходит по субстратоподобному механизму; основной вклад в образование комплекса вносят электростатические и гидрофобные взаимодействия. Кроме того, слабая ингибирующая активность в отношении ЭНЧ была показана также для ShPI-1 [53]. Известно, что ЭНЧ, как и катепсин G, играют большую роль в формировании и поддержании воспалительных процессов при легочных заболеваниях, таких как хроническая обструктивная болезнь легких, острый респираторный дистресс-синдром, муковисцидоз и другие [197,198]. Высокая концентрация этих ферментов в легочной ткани приводит к разрушению компонентов соединительной ткани, фрагменты которых вызывают секрецию слизи и активацию провоспалительных цитокинов [199]. Поэтому регулирование активности как ЭНЧ, так и катепсина G является важной медицинской задачей. Следует заметить, что НСИQ2с1 является единственным пептидом Кунитц-типа морских анемонов, для которого показано взаимодействие с катепсином G, что указывает на потенциал этого пептида в качестве противовоспалительного соединения.

Взаимодействие HClQ2c1 и HMIQ3c1 с калликреином может также свидетельствовать о противовоспалительной активности этих пептидов. Известно, что калликреин является одним из основных компонентов калликреин-кининовой системы, активация которой приводит к высвобождению брадикинина [200]. Появление этого пептида в плазме крови вызывает снижение артериального давления, повышение проницаемости микрососудов, сокращение гладких мышц, а также воспалительные процессы, сопровождающиеся болевым синдромом [200,201]. Поэтому регуляция активности ферментов калликреин-кининовой системы также требует особого внимания.

Для комплексов HClQ2c1_{im}/трипсин и HClQ2c1_{im}/α-химотрипсин были рассчитаны термодинамические параметры реакции комплексообразования в диапазоне температур от 10 °C до 40 °C с интервалом 5 °C. Подобно InhVJ [28], HCRG1 и HCRG2 [124], пептид HClQ2c1 образует энтропийно-зависимые комплексы с трипсином и α-химотрипсином: существенный вклад в образование комплексов вносит энтропийный фактор; положительные значения изменения энтальпии свидетельствуют о возможных разрывах водородных и электростатических связей или конформационных изменениях молекул при образовании комплексов [202] (таблица 6).

Таблица 6 – Термодинамические параметры образования комплексов пептидов Кунитц-типа с трипсином и/или α-химотрипсином

Пептид	Фермент	ΔH , кДж/моль	$T\Delta S$, кДж/моль	ΔG , кДж/моль	Ссылка
HClQ2c1	Трипсин	72,30	127,04	−54.70	[124]
	α -Химотрипсин	19,58	63,27	−43.70	
HCRG1	Трипсин	33,00	88,00	−55,00	
	α -Химотрипсин	28,00	77,00	−49,00	
HCRG2	Трипсин	39,00	92,00	−53,00	
	α -Химотрипсин	10,00	60,00	−50,00	
InhVJ	Трипсин	44,15	49,35	−5,20	[28]
	α -Химотрипсин	77,29	82,34	−5,50	
Примечания					
1 ΔH – изменение энтальпии.					
2 $T\Delta S$ – энтропийный фактор.					
3 ΔG – изменения энергии Гиббса.					

Таким образом, исследование взаимодействия IQ-пептидов с сериновыми протеазами показало, что HClQ4c7 является более специфичным пептидом, чем HClQ2c1 и HMIQ3c1, что, вероятно, связано с заменой Gly17Glu в сайте сильных взаимодействий с протеазами. Отсутствие связывания HMIQ3c1 с катепсином G может быть обусловлено заменами His50Arg и/или Ala51Arg. Установлены кинетические и термодинамические параметры

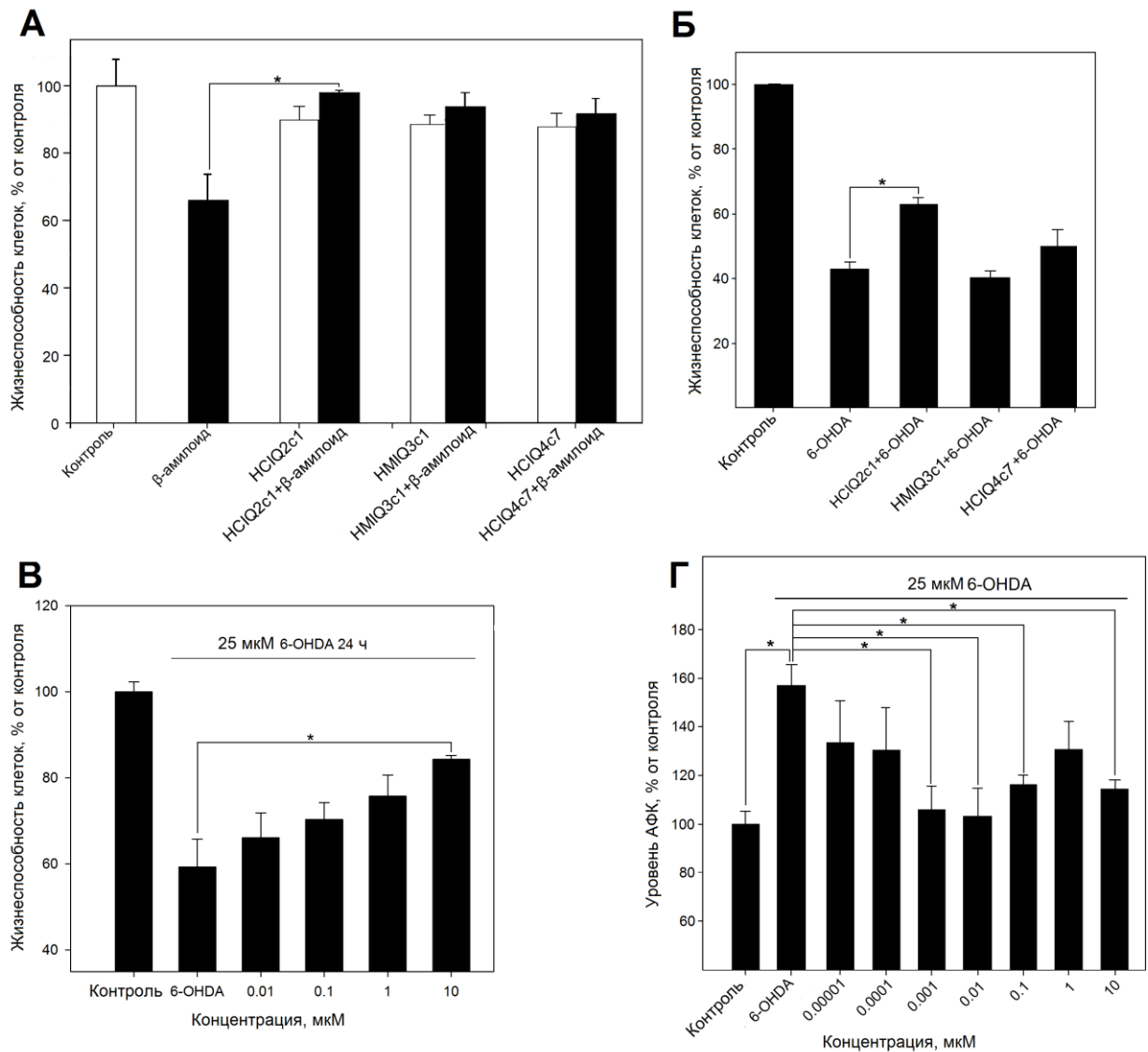
реакции образования комплексов между IQ-пептидами и сериновыми протеазами. Анализ термодинамических параметров комплексов HClQ2c1 с трипсином и α -химотрипсином выявил существенный вклад энтропийного фактора в реакцию комплексообразования. Взаимодействие IQ-пептидов с протеазами, участвующими в воспалительных процессах, предполагает наличие потенциальной фармакологической активности и создаёт перспективы для использования этих пептидов в качестве противовоспалительных средств.

2.3.3 Исследование нейропротективной активности IQ-пептидов

Как известно, воспалительные процессы запускаются в ответ на повреждение, инфекции и окислительный стресс, который играет ключевую роль в ряде нейродегенеративных заболеваний, включая болезни Альцгеймера и Паркинсона [203,204]. Для исследования нейропротективной активности природных и синтетических соединений активно применяют различные *in vivo* и *in vitro* модели, в которых в качестве нейротоксинов используют 1-метил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (MPTP), 6-гидроксидофамин (6-OHDA), β -амилоид, различные пестициды (ротенон, паракват) и др. [205,206].

Цитопротективная активность HClQ2c1, HClQ4c7 и HMIQ3c1 была исследована нами *in vitro* на клетках нейробластомы мыши Neuro2a. В качестве токсичных компонентов были использованы β -амилоид и 6-OHDA. Известно, что накопление β -амилоида в межклеточном пространстве приводит к образованию сенильных бляшек, которые нарушают синаптическую передачу путем взаимодействия с рецепторами (NMDAR, AMPAR) на поверхности нервных клеток, вызывая их гибель [207–209], тогда как 6-OHDA свободно проникает через клеточную мембрану посредством дофаминовых и норэпинефриновых транспортеров, ингибирует комплекс I дыхательной цепи митохондрий и стимулирует образование активных форм кислорода (АФК), вызывая окислительный стресс и гибель нейронов по механизму болезни Паркинсона [210].

Влияние IQ-пептидов на жизнеспособность клеток нейробластомы Neuro2a было оценено с помощью метода тетразолиевого окрашивания (MTT). Показано, что при инкубации клеток Neuro2a с IQ-пептидами в концентрации 10 мкМ в течение 24 ч ни один пептид не оказывает токсического действия на клетки (рисунок 34, А).



А – Влияние IQ-пептидов на жизнеспособность клеток нейробластомы Neuro2a в присутствии β-амилоида. Б – Влияние IQ-пептидов на жизнеспособность клеток нейробластомы Neuro2a в присутствии 6-OHDA. В – Концентрационная зависимость влияния HCIQ2c1 на жизнеспособность клеток Neuro2a в присутствии 6-OHDA. Г – Концентрационная зависимость влияния HCIQ2c1 на уровень АФК в клетках Neuro2a в присутствии 6-OHDA. Белые столбики показывают влияние пептидов на клетки Neuro2a в отсутствии β-амилоида и 6-OHDA. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=3), * $p < 0.05$

Рисунок 34 – Влияние IQ-пептидов на жизнеспособность клеток нейробластомы Neuro2a в присутствии β-амилоида и 6-OHDA

Цитопротективный эффект IQ-пептидов был исследован в *in vitro* модели β-амилоид-индуцированной цитотоксичности. При инкубации IQ-пептидов в концентрации 10 мкМ с клетками нейробластомы в присутствии β-амилоида (25 мкМ) наблюдалось увеличение жизнеспособности клеток на $49,2 \pm 1,4\%$, $38,3 \pm 7,1\%$ и $39,4 \pm 6,6\%$ для HCIQ2c1, HCIQ4c7 и HMIQ3c1 соответственно, по сравнению с контролем (рисунок 34, А). Эти результаты свидетельствуют о нейропротективной активности исследуемых пептидов в отношении клеток нейробластомы Neuro2a в присутствии β-амилоида.

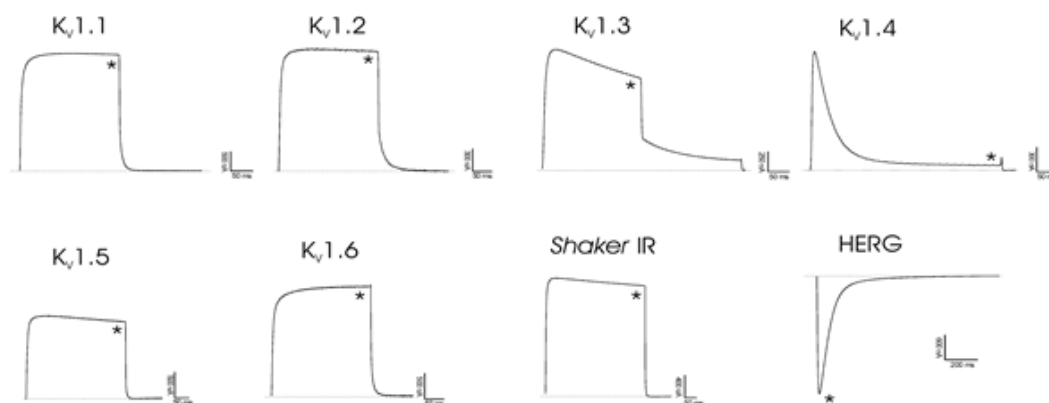
Исследование цитопротективного эффекта IQ-пептидов на клетки нейробластомы в присутствии 6-OHDA (25 мкМ) показало, что в концентрации 10 мкМ HClIQ4c7 и HClIQ2c1 увеличивали жизнеспособность клеток на $14 \pm 4,4\%$ и $47 \pm 4,8\%$ соответственно, по сравнению с контролем, при этом HMIQ3c1 не оказывал какого-либо положительного эффекта на клетки нейробластомы (рисунок 34, Б). Для HClIQ2c1 был установлен достоверный цитопротективный эффект. Показано, что он носит дозо-зависимый характер, а максимальная активность пептида наблюдается в концентрации 10 мкМ (рисунок 34, В). Как упоминалось выше, токсическое действие 6-OHDA сопровождается образованием АФК, которые вызывают окислительный стресс, губительный для клеток. С целью выяснения механизма цитопротективного действия HClIQ2c1 была оценена возможность этого пептида ингибировать образование АФК в клетках нейробластомы мыши. После инкубации клеток Neuro2a с HClIQ2c1 и 6-OHDA уровень АФК измеряли по интенсивности дихлорфлуоресцеина. Наиболее высокий уровень АФК наблюдался в клетках Neuro2a с 6-OHDA (контроль), тогда как предварительная обработка клеток HClIQ2c1 в концентрациях 0,001-0,01 мкМ приводила к снижению образования АФК. Максимальный эффект наблюдался в концентрации 0,01 мкМ, при которой уровень АФК снижался на $34 \pm 5,2\%$ по сравнению с контролем (рисунок 34, Г).

В концентрациях 0,1 и 1 мкМ HClIQ2c1 наблюдалось увеличение уровня АФК в клетках, который снова снижался при увеличении концентрации пептида до 10 мкМ. Это, вероятно, связано со сложным куполообразным характером влияния HClIQ2c1 на уровень АФК (рисунок 34, Г). Ранее нейропротективная активность была показана для Кунитц-подобного пептида, PсKuz3 из зоантиды *Palythoa caribaeorum*. Этот пептид подавлял нейротоксическое действие 6-OHDA на личинки *Danio rerio*. С помощью молекулярного моделирования было показано, что PсKuz3 является потенциальным блокатором Kv1.1 и Kv1.2 каналов. На основании этого авторы предположили, что механизм защитного эффекта PсKuz3 связан с его способностью блокировать Kv1 каналы [211].

Известно, что Kv каналы широко экспрессируются в нервных клетках и активно вовлекаются в регуляцию нейрональных процессов, поэтому их рассматривают как потенциальные мишени для лечения нейродегенеративных заболеваний, включая болезни Паркинсона и Альцгеймера [212–214]. Так, 4-аминопиридин, блокатор Kv1 и Kv3 каналов, подавляет нейродегенерацию и нарушения в поведении крыс, вызванные MPTP [215]; SHK-170 из *S. helianthus* ослабляет повреждения головного мозга, вызванные радиацией, посредством блокирования Kv1.3 [216]. Кроме того, SHPI-1 из *S. helianthus* способен блокировать три подтипа Kv каналов (Kv1.1, Kv1.2, Kv1.6) [157], HCRG1 и HCRG2 ингибируют активность пяти подтипов Kv1 каналов (Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.6 и *Shaker* IR) [156], а пептиды AsKC1-3 из *A. sulcata* блокируют Kv1.2 [51]. Высокая степень идентичности этих пептидов Кунитц-типа с IQ-

пептидами может указывать на потенциальную возможность последних блокировать K_v каналы.

Для подтверждения возможного механизма цитопротективной активности HSIQ2c1, HSIQ4c7 и HMIQ3c1 было проведено электрофизиологическое тестирование пептидов на восьми изоформах K_v1 ($K_v1.1$ – $K_v1.6$, HERG, *Shaker IR*) каналов, экспрессированных в ооцитах лягушки *Xenopus laevis* (рисунок 35). Установлено, что IQ-пептиды не влияют на активность K_v1 каналов. Эти результаты свидетельствуют о наличии иного механизма нейропротективной активности IQ-пептидов, отличного от вовлечения K_v1 каналов. Возможно, защитное действие IQ-пептидов связано с их взаимодействием с транспортерами, посредством которых нейротоксины проникают в клетку или действуют на нее, либо за счет ингибирования протеаз, участвующих в синтезе и/или деградации АФК.



Показаны кривые тока в условиях контроля и ингибитора. Пунктирной линией показан уровень нулевого тока. Звездочкой (*) отмечены постоянные следы тока после введения 50 мкМ пептидов

Рисунок 35 – Профиль активности IQ-пептидов на восьми подтипах K_v1 каналов

Таким образом, впервые показано, что пептиды Кунитц-типа морских анемонов способны снижать токсический эффект β -амилоида и 6-OHDA на нейрональные клетки и подавлять развитие окислительного стресса в результате снижения уровня АФК. Показано, что IQ-пептиды не оказывают влияния на активность K_v1 каналов, что предполагает наличие иного нейропротективного механизма, не связанного с блокированием K_v каналов.

3 Материалы и методы

3.1 Материалы и оборудование

3.1.1 Материалы

В работе использовали N- α -бензоил-D,L-аргинин-п-нитроанилид (BAPNA), 2-хлоро-4-нитрофенил- α -D-мальтотриозу, Трис-HCl (Helicon, Россия), трипсин, этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА) (динатриевая соль), N,N-диметилформамид (ДМФА), диметилсульфоксид (ДМСО), хлорид натрия, глицерин, 2-(N-морфолино)-этансульфоновую кислоту (MES), бромциан (BrCN), 4-винилпиридин, синапиновую кислоту, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид (МТТ), фексофенадин (Sigma, США); реактивы для электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ), β -меркаптоэтанол, агарозу (BioRad, США); бычий сывороточный альбумин (БСА) (Reanal, Венгрия); трифторуксусную кислоту (ТФУ) (Merck, Германия); дейтериевая вода D₂O (Deutero GmbH, Германия); ацетонитрил 0 сорта (Криохром, Россия); стандарты молекулярных масс Page Ruler Unstained Broad Range Protein Ladder, эндонуклеазы рестрикции *EcoRI* и *XhoI*, буферный раствор для эндонуклеаз рестрикции Tango, T4-ДНК-лигазу (Thermo Fisher Scientific, США); стандарты молекулярных масс ДНК DNA Ladder (100-3000 н.п.) (Сибэнзим, Россия), смесь дезоксинуклеотидов (дНТФ), GoTaq ДНК-полимеразу и буферный раствор для GoTaq-полимеразы (Promega, Thermo Fisher Scientific, США), набор реактивов для секвенирования ДНК BigDye Terminator v.3.1 3.1 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, США); изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ), имидазол (Helicon, Россия); Ni²⁺-NTA агарозу (Qiagen, Нидерланды); плазмидный вектор pTZ57R/T (Thermo Fisher Scientific, США), плазмиду pET-32b(+) (Novagen, Германия), набор для клонирования InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, США); дитиотреитол (Fluka bioChemika, Канада); флуоресцентные зонды Fluo-3/AM, DCFH-DA и FA-OMe, карбенициллин (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific США); 2,7-дихлордигидрофлюоресцеин диацетат; компоненты сред для культивирования клеток *E. coli* (бакто-пептон, бакто-агар и дрожжевой экстракт) (Difco, США), состав сред указан в таблице 7; гентамицин, среда DMEM, эмбриональная бычья сыворотка (BioloT, Россия); штаммы *E. coli* XL-1 Blue (Stratagene, США), Top10 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США) и BL21 (DE3) (Novagen, Германия); культуры клеток Neuro2a (ATCC CCL-131, Американская коллекция типовых культур, США); хроматографическая колонка Jupiter C₄ (10×250 мм) (Phenomenex, США); HEPES-NaCl буферный раствор (GE Healthcare, США); олигонуклеотиды, синтезированные фирмой ЗАО «Евроген» (Россия) (таблица 8).

Все остальные реактивы отечественного производства имели квалификацию «о.с.ч.» или «ч.д.а.», импортные реактивы имели маркировку «для молекулярной биологии» или «для

аналитической работы». Все растворы были приготовлены с использованием деионизованной воды (сопротивление 18,2 МОм), полученной на установке Milli-Q system (Millipore, США).

Таблица 7 – Среда

Название	Компоненты для приготовления 1 л среды
LB	10 г бакто-триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 10 г NaCl.
LB-Agar	10 г бакто-триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 10 г NaCl, 15 г бакто-агара.

Таблица 8 – Праймеры, использованные в работе

Название праймера	Последовательность (5'–3')	Назначение
Inh_SIG_all_F	CAAAGACAAGATAACAAGATGAAGGGA	Установление разнообразия транскриптов IQ-пептидов, установление структуры генов
Inh_XhoI_R	ACTCGAGTTACGCCCTGCATATAGCTCGGCAT	
SIG_GN_F	AGGTTTCTATTTTCAGAAGCATTCAAGGT	
Inh_PRO_GN_R	ATGTTACCTTGAATCCTTTTG	Установление структуры генов
A_Mid1sig_allF	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACACGACGACT CAAAGACAAGATAACAAGATGAAGGGA	Глубокое секвенирование ампликонов
A_Mid2sig_allF	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACACGTAGTAT CAAAGACAAGATAACAAGATGAAGGGA	
B_inh_R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTAACAAGATT ACGCCCTCCATA	
GN-EcoR_F	GCGAATTCGATGATTCAAGGTAACATTTGTTCA	Амплификация зрелых последовательностей генов IQ-пептидов
M13 F	GTAAAACGACGGCCAGT	Секвенирование фрагментов, клонированных в pTZ57R/T
M13 R	CAGGAAACAGCTATGAC	
T7_F	TAATACGACTCACTATAGGG	Секвенирование фрагментов, клонированных в pET32b(+)
T7_R	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	

3.1.2 Оборудование

В работе использовали следующее оборудование: концентратор Concentrator 5301 (Eppendorf, Германия), термостат CH-100 (BioSan, Латвия), шейкеры-инкубаторы Enviromental Shaker-Incubator ES-20 (BioSan, Латвия) и Shaker-Incubator Ecotron (INFORS HT, Швейцария),

камеру для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN TetraCell (BioRad, США), камеру для горизонтального электрофореза SUB-CELL GT (BioRad, США), систему геледокументирования VersaDoc 4000 (BioRad, США), центрифуги 5810 R и miniSpin (Eppendorf, Германия), ультразвуковой дезинтегратор Sonopuls HD 2070 (Bandelin, Германия), спектрофотомер CE 1021 (Cecil, Великобритания), спектрофотометр NanoPhotometer (Implen, Германия), планшетный ридер xMark (BioRad, США), спектрофотометр Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific, США), планшетный спектрофлуориметр PHERAstar FS (BMG Labtech, Германия), аналитические весы Kern AGB (Kern, Германия), амплификатор DNA Engine PTC-0200 (BioRad, США), лиофильную сушику Иней-4 (ИБП РАН, Россия), роторный испаритель Rotavapor R-200 (Büchi, Германия), хроматограф Agilent 1100 (Agilent Technologies, США), электропоратор Multiporator (Eppendorf, Германия), времяпролётный масс-спектрометр Ultraflex III MALDI-TOF/TOF (Bruker, Германия), автоматический секвенатор белков Procise 492 cLC (Applied Biosystems, США), генетический ДНК анализатор ABI 3130xl (Applied Biosystems, США), пиросеквенатор GS Junior (Roche/454, Life Sciences); микроинжектор Nanoject II (Drummond Scientific Company, США), электрофизиологическую установку Geneclamp 500 (Axon Instruments, Великобритания); спектрометр Avance III 700 (Bruker, США), спектрометр Chirascan-plus CD (Applied Photophysics Limited, Великобритания); спектрополяриметр Jasco-500A (Jasco, Япония), биосенсор Biacore 3000 (GE Healthcare, USA).

3.1.3 Биологический материал

Образцы актиний *H. crispa* и *H. magnifica* были собраны в заливе Нячанг (Южно-Китайское море, Вьетнам) в ходе научно-исследовательских экспедиций на НИС «Академик Опарин» (2010 г.). Видовая принадлежность образцов актиний была определена сотрудником ННЦМБ ДВО РАН, к.б.н. Костиной Е.Е.

3.2 Методы

3.2.1 Идентификация транскриптов, кодирующих IQ-пептиды

3.2.1.1 Выделение РНК и синтез кДНК *H. crispa* и *H. magnifica*

Суммарная РНК была выделена из тканей щупалец *H. crispa* и *H. magnifica* с использованием набора ExtractRNA (Евроген, Россия). РНК была растворена в деионизованной воде и хранилась при минус 70 °С. Целостность РНК была оценена с помощью гелеэлектрофореза, концентрация и степень чистоты определялась спектрофотометрически. Синтез и получение амплифицированной кДНК проводили с использованием 2 мкг суммарной РНК, предварительно обработанной ДНКазой I (Thermo Fisher, США), и набора реактивов MINT Universal (Евроген, Россия).

3.2.1.2 Амплификация транскриптов, кодирующих IQ-пептиды

ПЦР-амплификацию последовательностей, кодирующих IQ-пептиды, проводили в два этапа. На первом этапе амплификацию фрагментов проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 2,5 мкл буферного раствора для GoTaq ДНК-полимеразы (10х), 2,5 мкл смеси дНТФ (концентрация каждого – 2 мМ), 0,13 мкл GoTaq ДНК-полимеразы (5 ед./мкл), 2,5 мкл праймера Inh_SIG_all_F (10 мкМ), 2,5 мкл праймера Inh_XhoI_R (10 мкМ), 1 мкл кДНК *H. crispa* (1:20) в качестве матрицы при следующих условиях: 95 °С – 2 мин; 30 циклов 94 °С – 30 с; 60 °С – 30 с; 72 °С – 1 мин; 72 °С – 3 мин.

На втором этапе ПЦР проводили в реакционной смеси, содержащей по 2,5 мкл праймера SIG_GN_F (10 мкМ) и Inh_XhoI_R (10 мкМ) при тех же условиях. В качестве матрицы были использованы кДНК *H. crispa* и *H. magnifica*. ПЦР-фрагменты (250 и 200 п.н.) были клонированы в вектор pTZ57R/T (Thermo Fisher Scientific, USA), согласно рекомендациям производителя.

3.2.1.3 Электрофорез фрагментов ДНК

Анализ фрагментов ДНК проводили с помощью электрофореза в 1% или 1,5% агарозном геле при напряжении 80 V в буфере TAE (40 мМ Трис-ацетатный буферный раствор pH 7,6, 1мМ ЭДТА). В качестве стандартов использовали маркеры молекулярных длин и веса ДНК 100–3000 н.п. Агарозный гель окрашивали бромистым этидием (1 мкг/мл). Визуализацию образцов осуществляли при помощи УФ-трансиллюминатора и системы геле-документирования VersaDoc 4000 (Bio-Rad, США).

3.2.1.4 Получение генетических конструкций на основе вектора pTZ57R/T

Очистку ПЦР-фрагментов (250 и 200 п.н.) проводили с помощью набора Clean Up Mini (Евроген, Россия) по инструкции производителя. Лигирование ПЦР-фрагментов в плазмидный вектор pTZ57R/T проводили с помощью набора InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, США) в реакционной смеси объемом 10 мкл: 1 мкл вектора (5 нг/мкл), 1 мкл вставки (27 нг/мкл), 1 мкл буферного раствора для T4 ДНК-лигазы (10х), 0,2 мкл T4 ДНК-лигазы (5 ед./мкл). Реакцию лигирования проводили при 14 °С в течение 16–18 ч, лигазу инактивировали в течение 20 мин при 80 °С.

Компетентные клетки *E. coli* штамма Top10 трансформировали 1 мкл лигазной смеси путем электропорации при напряжении 1700 В (5 мсек). Затем к клеткам добавляли 1 мл среды LB, инкубировали при 37 °С в течение 60 мин при 180 об/мин и рассеивали шпателем на чашки Петри со средой LB-агар с карбенициллином (100 мкг/мл). Чашки инкубировали при 37 °С в течение 16–18 ч.

3.2.1.5 Отбор колоний, содержащих рекомбинантную плазмиду

Наличие вставки в клетках *E. coli* штамма Top10 проверяли методом ПЦР «на колониях». Реакционная смесь объемом 10 мкл для каждой колонии содержала: 1 мкл буферного раствора для GoTaq ДНК-полимеразы (10х), 1 мкл смеси дНТФ (концентрация каждого – 2 мМ), 1 мкл праймера M13 F (10 мкМ), 1 мкл праймера M13 R (10 мкМ), 0,1 мкл GoTaq ДНК-полимеразы (5 ед./мкл). Клетки отобранных колоний добавляли в реакционную смесь, а также переносили на новую чашку Петри со средой LB-агар, содержащей карбенициллин (100 мкг/мл), и инкубировали при 37 °С в течение 16–18 ч. В качестве отрицательного контроля использовали аликвоту плазмиды pTZ57R (Thermo Fisher Scientific, США). Реакцию проводили на амплификаторе при следующих условиях: 95 °С – 10 мин, затем 30 циклов: 94 °С – 20 сек, 55 °С – 20 сек, 72 °С – 20 сек, затем 72 °С – 5 мин. Результаты визуализировали при помощи электрофореза в 1,5% агарозном геле. Для дальнейшего выделения рекомбинантных плазмид отбирали лишь те колонии, которые в ПЦР давали фрагменты соответствующей длины. Отобранные колонии переносили в 5 мл жидкой среды LB с добавлением карбенициллина (100 мкг/мл) и инкубировали при 180 об/мин при 37 °С в течение 18 ч.

3.2.1.6 Секвенирование ДНК

Секвенирование ПЦР-фрагментов и рекомбинантных плазмид проводили с использованием стандартных M13- и T7-праймеров (таблица 8) и коммерческого набора реактивов BigDye™ Terminator v.3.1 на генетическом ДНК анализаторе ABI 3130xl (Applied Biosystems, США) в соответствии с рекомендациями и протоколами производителя.

3.2.1.7 Выделение плазмидной ДНК

Плазмидную ДНК выделяли при помощи набора Plasmid Miniprep (Евроген, Россия) по методике, рекомендованной производителем. Количество и чистоту плазмид анализировали при помощи 1% агарозного гель-электрофореза в буфере TAE.

3.2.1.8 Глубокое секвенирование ампликонов

На этапе планирования эксперимента по изучению разнообразия последовательностей ингибиторов Кунитц-типа из *H. crispa* и *H. magnifica* для глубокого секвенирования ампликонов была выбрана схема «однонаправленных ридов» (One-Way Reads) в соответствии с руководством по экспериментальному дизайну ампликонов (Guidelines for Amplicon Experimental Design (Roche/454, Life Sciences)). Для создания библиотек были сконструированы химерные праймеры (таблица 8). Амплификацию проводили с использованием кДНК *H. crispa* и *H. magnifica* в присутствии праймеров A_Mid1sig_allF/B_inh_R и A_Mid2sig_allF/B_inh_R, соответственно, и GoTaq ДНК-полимеразы (Promega, USA) при следующих условиях: 95 °С – 3 мин; 35 циклов при 94 °С – 30 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 1 мин; 72 °С – 15 мин. Полученный пул

ампликонов был качественно проанализирован и очищен методом электрофореза в агарозном геле. Количественную оценку проводили с использованием УФ-флуориметра QuantiFluor-ST (Promega, USA) и набора реагентов Quant-iT PicoGreen dsDNA (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США). Клональная амплификация аликвоты библиотеки с концентрацией 1×10^6 молекул/мкл была осуществлена методом эмульсионной ПЦР при следующих условиях: 94 °C – 4 мин; 50 циклов при 94 °C – 30 с, 58 °C – 4,5 мин, 68 °C – 30 с. Амплификация, очистка и обогащение несущих частиц, а также секвенирование были проведены в соответствии с инструкциями производителя (GS Junior Titanium Series emPCR Amplification Method Manual - Lib-A и Sequencing Method Manual (Roche/454, Life Sciences)). Анализ полученных данных был проведен с использованием программного обеспечения производителя – GS Amplicon Variant Analyzer (AVA, v3.0), согласно инструкции протокола 454 (Sequencing System Software Manual, часть Д). В качестве референсной последовательности была использована НП HClQ2c1.

3.2.1.9 Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей

Анализ полученных нуклеотидных и выведенных аминокислотных последовательностей проводился в программах Vector NTI v.10 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США) и MEGA6 [217]. Поиск гомологов аминокислотных последовательностей проводили в базе данных GeneBank, используя BLASTN и BLASTP алгоритмы [218].

3.2.2 Установление структуры гена IQ-пептидов

Для установления структуры гена гДНК была выделена из щупалец *H. crispa* и *H. magnifica* путем гомогенизации в тиоцианате гуанидина с последующей экстракцией в фенол-хлороформе [219]. Амплификацию генов IQ-пептидов проводили с использованием двух наборов ген-специфичных праймеров: 1 – Inh_SIG_all_F и Inh_PRO_GN_R; 2 – SIG_GN_F и Inh_XhoI_R при следующих условиях: 95 °C – 2 мин; 30 циклов 94 °C – 30 с; 60 °C – 30 с; 72 °C – 1 мин; 72 °C – 3 мин. кДНК была использована в качестве контроля. Полученные ПЦР-фрагменты были клонированы в pTZ57R/T (Thermo Fisher Scientific, USA) и секвенированы с помощью универсальных M13-праймеров в соответствии с пунктами 3.2.1.4 и 3.2.1.6 соответственно.

3.2.3 Филогенетический анализ

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей предшественников IQ-пептидов был проведен с помощью программы MEGA6 [217] методом ближайших соседей (Neighbor-Joining) [220]. Достоверность филогенетического дерева оценивали «bootstrap»-тестом (1000 реплик) [221]. Эволюционные дистанции были рассчитаны методом «p-distance» [222] при попарном сравнении последовательностей. В качестве внешней группы были использованы последовательности BPTI из *B. taurus* и SHTX-III из *S. haddoni*.

3.2.4 Компьютерное моделирование IQ-пептидов и анализ молекулярного электростатического потенциала

Компьютерное моделирование пространственных структур HClQ-, HMIQ- и HCGS-пептидов и расчет МЭП были выполнены с.н.с. ТИБОХ ДВО РАН к.ф-м.н. Зелепуга Е.А. Модели пространственной структуры пептидов Кунитц-типа были построены методом гомологичного моделирования с помощью программного обеспечения Modeller 9.11 [223] и Chimera 1.9 [224]. В качестве прототипа использовали координаты атомов пептида Кунитц-типа SHPI-1 из актинии *S. helianthus* (PDB ID 1SHP), т.к. идентичность АП между IQ-пептидами и SHPI-1 составила 87–94%. Качество моделей оценивали с помощью веб-сервера PROCHECK [225,226] и программы MOE (Chemical Computing Group, Inc.; <http://www.chemcomp.com/>). Расчет молекулярных масс пептидов осуществляли с помощью программного обеспечения Vector NTI v.10 (Invitrogen, США). Общий заряд молекул и pI рассчитывали на основании 3D-моделей, используя программу PROPKA 2.0 [227].

Для каждой пространственной модели пептидов Кунитц-типа было рассчитано распределение МЭП и построены их эквипотенциальные поверхности с помощью программы SPDBV 4.1 (<http://spdbv.vital-it.ch/>). Кластеризацию HClQ, HMIQ и HCGS пептидов проводили на основании результатов анализа электростатических свойств моделей, используя webPIPSA server (<http://pipsa.h-its.org/>) [181].

3.2.6 Получение рекомбинантных пептидов

3.2.6.1 Получение рекомбинантных конструкций на основе вектора pET32b(+)

Амплификацию НП, кодирующих зрелые пептиды HClQ2c1, HClQ4c7, HClQ1c9 и HMIQ3c1, проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 2 мкл буферного раствора для GoTaq ДНК-полимеразы (10х), 2 мкл смеси дНТФ (каждого по 2 мМ), 11,4 мкл деионизованной воды, 0,1 мкл GoTaq ДНК-полимеразы (5 ед./мкл), 0,5 мкл матрицы (20-50 нг/мкл), 2 мкл праймера GN_EcoR_F (10 мкМ) и 2 мкл праймера Inh_XhoI_R (10 мкМ) при следующих условиях: 95 °С – 3 мин; 30 циклов 94 °С – 30 с; 55 °С – 30 с; 72 °С – 1 мин; 72 °С – 3 мин. В качестве матрицы были использованы рекомбинантные плазмиды pTZ57R, содержащие корректные вставки генов. ПЦР-фрагменты (около 250 п.н.) и векторная плазида pET-32b(+) были обработаны эндонуклеазами рестрикции EcoRI и XhoI при 37 °С в течение 16 ч. Реакционная смесь объемом 30 мкл включала: 6 мкл буферного раствора Tango (10х), 1 мкл EcoRI (10 ед./мкл), 1 мкл XhoI (10 ед./мкл), 340 нг вектора pET-32b(+) или 125 нг фрагментов ДНК. Инактивацию эндонуклеаз осуществляли при 80 °С в течение 20 мин. Полученные фрагменты выделяли из реакционной смеси с помощью набора Cleanup Standard (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. Лигирование ПЦР-фрагментов в плазмидный вектор pET-32b(+) проводили согласно пункту 3.2.1.4.

3.2.6.2 Отбор колоний, содержащих рекомбинантную плазмиду

Наличие в рекомбинантной плазмиде корректной вставки в клетках *E. coli* штамма XL1 Blue тестировали методом ПЦР «на колониях» в присутствии стандартных праймеров T7_F и T7_R, как описано в пункте 3.2.1.5. Реакцию проводили при следующих условиях: 95 °C – 5 мин, затем 25 циклов: 94 °C – 30 сек, 55 °C – 30 сек, 72 °C – 30 сек, затем 72 °C – 5 мин. Результаты визуализировали при помощи электрофореза в 1,5% агарозном геле. Выделение плазмидных ДНК осуществляли в соответствии с пунктом 3.2.1.7. Секвенирование рекомбинантных плазмид проводили согласно пункту 3.2.1.6 с использованием тех же праймеров (таблица 8).

3.2.6.3 Гетерологичная экспрессия

Клетки *E. coli* штамма BL21(DE3) трансформировали рекомбинантными плазмидами и наращивали в среде LB с добавлением карбенициллина (100 мкг/мл) в объеме 1 л при 37 °C и интенсивной аэрации (180 об/мин) до достижения оптической плотности $A_{600} = 0,4\text{--}0,6$. Экспрессию индуцировали добавлением индуктора ИПТГ в конечной концентрации 0,2 мМ (НСIQ2с1) или 0,3 мМ (НСIQ4с7), или 0,5 мМ (НСIQ1с9 и НМИQ3с1) и продолжали наращивание клеток в течение 3 ч при температуре 37 °C и интенсивной аэрации (180 об/мин) для получения гибридного белка в растворимой форме. Затем клетки осаждали центрифугированием (6000 об/мин в течение 6 мин). Оценку экспрессии проводили при помощи электрофореза в ПААГ (12%).

3.2.6.4 Электрофорез в ПААГ

Денатурирующий электрофорез выполняли на приборе Mini-PROTEAN в вертикальных пластинах (9×12×0,075 см) с 12% ПААГ в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия, объем лунок 15 мкл. Электрофорез проводили в буферном растворе, содержащем 25 мМ Трис-НСl (рН 8,3), 250 мМ глицина и 0,1% додецилсульфата натрия. Перед нанесением в лунки к образцам добавляли буферный раствор (2% SDS, 20% глицерин, 10% 2-меркаптоэтанол, 2,1 мМ ЭДТА, 20 мМ Трис-НСl (рН 8,0) и 0,002% (w/v) бромфеноловый синий) в соотношении 1:1 (v/v) и прогревали при температуре 100 °C в течение 15 мин. В качестве стандартов использовали Page Ruler Unstained Broad Range Protein Ladder. Фиксацию гелей осуществляли в растворе 50% метанола и 10% уксусной кислоты в течение 18 ч. Окрашивание гелей проводили в течение часа в растворе 0,25% Кумасси R-250 и 10% уксусной кислоты. Отмывку геля от красителя проводили 10% уксусной кислотой.

3.2.6.5 Выделение гибридного белка методом металл-аффинной хроматографии

Осажденные после экспрессии клетки ресуспендировали в 30 мл буферного раствора (0,02 М Трис-НСl, рН 7,5–8,0, 0,4 М NaCl, 1% глицерин), обрабатывали ультразвуком на

дезинтеграторе Sonopuls HD 2070 для разрушения клеточной оболочки. После центрифугирования (10000 об/мин, 10 мин) супернатант наносили на колонку с Ni^{2+} -NTA агарозой. Для удаления белков клеточного лизата Ni^{2+} -NTA агарозу с гибридным белком промывали буферным раствором, содержащим 0,02 М Трис-НCl, pH 7,5–8,0, 0,4 М NaCl, 10 мМ имидазол. Гибридный белок элюировали с колонки буферным раствором, содержащим 0,02 М Трис-НCl, pH 7,5–8, 0,4 М NaCl и 250 мМ имидазол. После окончания работы колонку с носителем промывали раствором 20 мМ MES и затем водой.

3.2.6.6 Измерение концентрации белка по спектру поглощения

Концентрацию очищенных гибридных белков и целевых пептидов в растворе измеряли по поглощению в УФ-области спектра с диапазоном длин волн 200–400 нм. Расчет концентрации производили по формуле: $C = (A_{280} - A_{320}) / (\epsilon_{280} \times l)$, где C – концентрация, моль/л; A_{280} , A_{320} – оптическая плотность раствора при 280 и 320 нм соответственно; ϵ_{280} – расчетный молярный коэффициент поглощения при 280 нм, l – длина оптического пути (в работе использовали кюветы с длиной оптического пути 1 см). Значения молярного коэффициента поглощения при 280 нм для пептидов с известной аминокислотной последовательностью рассчитывали с помощью биоинформатического портала ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>).

3.2.6.7 Гидролиз гибридного рекомбинантного белка

Гидролиз гибридного белка осуществляли BrCN по остатку метионина по модифицированной методике [228]. Раствор, содержащий рекомбинантный пептид, разбавляли до концентрации 1 мг/мл, затем добавляли HCl и BrCN до конечной концентрации 0,2 М и 0,025 М соответственно. Реакционную смесь инкубировали 16–18 ч при комнатной температуре в темноте, затем упаривали на вакуумном концентраторе Concentrator 5301, чтобы избавиться от избытка BrCN.

3.2.6.8 Выделение рекомбинантного пептида методом ОФ ВЭЖХ

Выделение целевого рекомбинантного пептида из реакционной смеси проводили на колонке с обращенной фазой носителя Jupiter C₄ (10×250 мм) в линейном градиенте концентрации ацетонитрила от 0 до 70% в 0,1% ТФУ при pH 2,2, в течение 70 мин при скорости потока 1,5 мл/мин.

3.2.6.9 ^1H ЯМР спектры

Спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР) получали при 30 °С на спектрометре Avance III 700, оснащенном z-градиентным датчиком тройного резонанса ТХО. Пептиды растворяли в 90% H_2O /10% D_2O в концентрации 1,5–2 мг/мл. Для подавления сигнала

растворителя, химический сдвиг которого был принят как 4,7 м.д. (миллионные доли), использовали метод селективного возбуждения формованным импульсом с применением импульсного градиента магнитного поля [229].

3.2.6.10 Спектры кругового дихроизма

Регистрацию спектров кругового дихроизма (КД) проводили на спектрометре Chirascan-plus CD в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 0,1 и 1 см для съемки спектров в пептидной (190-240 нм) и ароматической (230-310 нм) областях соответственно. Кювету с раствором пептида в концентрации 1 мг/мл в деионизированной воде термостатировали при заданной температуре в течение 20–25 мин до снятия спектра КД. Получение спектров проводили в диапазоне температур от 25 до 100 °С. Содержание элементов вторичной структуры белка рассчитывали методом Провенчера–Глокнера [230], используя усовершенствованные программы расчета по методу Провенчера из пакета программ CD Pro [231].

3.2.7 Исследование биологической активности пептидов

3.2.7.1 Определение константы ингибирования трипсина

Определение константы ингибирования трипсина рекомбинантными пептидами проводили по методу Диксона [194] спектрофотометрически в 96 луночной планшете. К 10 мкл 0,2 мкМ раствора трипсина в 50 мМ Трис-НСl, рН 8,0, добавляли исследуемый пептид в различных концентрациях, после чего объем реакционной смеси доводили исходным буферным раствором до 150 мкл и инкубировали в течение 10 мин при 37 °С. Далее вносили по 50 мкл раствора субстрата в 50 мМ Трис-НСl буфере, рН 8,0, содержащем 10% ДМФА. В качестве субстрата использовали BAPNA в концентрациях 0,6 и 1,2 мМ. Количество образовавшегося п-нитроанилина определяли через 30 мин инкубации при 37 °С путем измерения оптического поглощения при 410 нм на планшетном спектрофотометре xMark. Константы ингибирования рассчитывали по данным трех параллельных экспериментов.

3.2.7.2 Установление взаимодействия с сериновыми протеазами

Установление взаимодействия рекомбинантных пептидов с сериновыми протеазами (трипсином, α -химотрипсином, эластазой нейтрофилов человека, панкреатическим калликреином и катепсином G) осуществляли методом поверхностного плазмонного резонанса на биосенсоре Biacore 3000, управляемом программным обеспечением Biacore 3000 Control Software 1.0. Пептиды были иммобилизованы на карбоксиметилированную поверхность сенсорного чипа CM4, активированную смесью NHS/EDC (N-гидроксисукцинимид/1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимидгидрохлорид), путём инъекции раствора пептида (100

мкг/мл) в 10 мМ растворе ацетата натрия (pH 5,5) в течение 10 мин со скоростью потока 5 мкл/мин. Количество иммобилизованных пептидов составило порядка 400–1000 RU (resonance units, 1 RU соответствует 1 пг пептида). Для корректной оценки сигнала биосенсора в качестве контроля использовали ячейку без иммобилизованного пептида. Растворы ферментов в концентрациях от 1 до 500 нМ пропускали через измерительный и контрольный каналы биосенсора при температуре 25 °С в течение 5 мин при скорости потока 5 мкл/мин. В качестве рабочего буферного раствора был использован HEPES-NaCl буферный раствор (0,15 М NaCl, 0,01 М HEPES, pH 7,4). Последующий распад комплексов регистрировали в течение не менее 10 мин. После каждого цикла измерения поверхность чипа регенерировали путем введения 50 мМ NaOH в течение 30 с со скоростью потока 50 мкл/мин. Изменение свободной энергии Гиббса (ΔG) при 25 °С рассчитывали по формуле:

$$\Delta G = RT \ln K_D, \quad (1)$$

где ΔG — изменение энергии Гиббса, R — универсальная газовая постоянная, T — абсолютная температура, K_D — равновесная константа диссоциации комплекса. По уравнению

$$\ln(K_D) = f(1/T) \quad (2)$$

были построены графики Вант-Гоффа, изменение энтальпии (ΔH) в ходе взаимодействия молекул было получено как значение тангенса угла наклона графика. Значение изменения энтропии ΔS в ходе взаимодействия было рассчитано из уравнения:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S. \quad (3)$$

Экспериментальная работа проводилась в Институте биомедицинской химии РАМН им. В.Н. Ореховича, г. Москва, в лаборатории межмолекулярных взаимодействий под руководством зав. лабораторией д.б.н. Иванова А.С. и с участием к.б.н. Калужского Л.А.

3.2.7.3 Электрофизиологические исследования

Для экспрессии различных изоформ K_V каналов ($rK_V1.1$ – $rK_V1.6$, *Shaker IR* и *hERG*, где r — канал крысы, h — канал человека) в ооцитах *Xenopus laevis* соответствующие гены клонировали в плазмиду pSP64T и линейаризовали. Кэпированные мРНК синтезировали с помощью систем для транскрипции mMESSAGE mMACHINE T7 или SP6. Раствор РНК (50 нл с концентрацией 1 нг/нл) вводили в ооциты с помощью микроинжектора Nanoject II, после чего клетки инкубировали 2–4 дня в буферном растворе ND96 (96 мМ NaCl, 2 мМ KCl, 1,8 мМ CaCl₂, 2 мМ MgCl₂, 5 мМ HEPES, pH 7,4) с добавлением гентамицинсульфата (50 нг/л). Эксперименты по установлению физиологической активности соединений на ооцитах, экспрессирующих канальные белки, проводили при комнатной температуре (18–22 °С) методом

двухэлектродной фиксации потенциала на электрофизиологической установке Geneclamp 500, управляемой системой сбора данных pClamp (Axon Instruments, США). Регистрацию токов от целой клетки осуществляли в течение 1–4 дней после введения мРНК. Сопротивление электродов составляло 0,7–1,5 МОм. Сигнал, усиленный и предварительно отфильтрованный встроенным в усилитель четырехполюсным фильтром Бесселя (частота среза 500 Гц), оцифровывали на частоте 2000 Гц. Записи, полученные до активации исследуемых токов, использовали для вычитания тока утечки и тока через другие каналы. При записях интегральных токов клетки потенциал мембраны поддерживали на уровне минус 90 мВ. Для $K_v1.1$ – $K_v1.6$ и *Shaker IR* потенциал на мембране изменяли до 0 мВ за 250 мс с последующим импульсом до минус 50 мВ за 250 мс. Активацию hERG вызывали за счет преимпульса до +40 мВ за 2 с с последующим шагом до минус 120 мВ за 2 с. Связь между током и напряжением устанавливали путем изменения потенциала на мембране с шагом в 10 мВ. Сравнение двух состояний проводили с помощью коэффициента Стьюдента ($p < 0,05$). Все данные представлены в трех независимых экспериментах ($n \geq 3$). Анализ полученных результатов осуществляли с помощью программ pClamp Clampfit 10.0 (Molecular Devices, USA) и Origin 8.5 (Originlab, USA).

Экспериментальная работа проводилась в Католическом университете Левена, г. Левен, Бельгия, в лаборатории токсикологии под руководством зав. лаб., профессора Титгата Я. и с участием PhD Пеньера С.

3.2.7.3 Определение цитопротективной активности в модели 6-ОНДА-индуцированной токсичности

Цитопротективную активность рекомбинантных пептидов определяли на клетках нейробластомы мыши Neuro2a. Клетки культивировали в среде DMEM с 10% эмбриональной бычьей сывороткой и гентамицином (80 мкг/мл). Клетки вносили в 96-луночный планшет в концентрации 1×10^3 клеток на лунку. Рекомбинантный пептид добавляли в разных концентрациях и через 1 ч добавляли 6-гидроксидофамин (6-ОНДА) в конечной концентрации 25 мкМ. Затем клетки инкубировали 24 ч при 37 °C и 5% CO₂. После этого питательную среду заменяли на чистую бессывороточную и клетки обрабатывали 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид (МТТ) и инкубировали 4 ч. Затем отбирали всю среду и лизировали клетки в 100% диметилсульфоксиде, оптическую плотность измеряли при 570 нм, используя спектрофотометр Multiscan FC. Результаты получены в трех независимых экспериментах и показаны как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка.

3.2.7.4 Определение содержания активных форм кислорода (АФК)

Внутриклеточный уровень АФК оценивали с помощью раствора 2,7-дихлордигидрофлюоресцеин диацетата (H2DCFDA). Клетки нейробластомы Neuro2a вносили в 96-луночный планшет в концентрации 1×10^3 клеток на лунку и дважды отмывали средой DMEM и инкубировали 1 ч в среде MEM, не содержащей сыворотки, в присутствии рекомбинантного пептида в концентрациях от 10 пМ до 10 мкМ. Затем к клеткам добавляли 6-OHDA до конечной концентрации 25 мкМ и инкубировали 30 мин при 37 °C и 5% CO₂. После отмывки клеток натрий-фосфатным буферным раствором (0,137 М NaCl, pH 7,4, 0,0027 М KCl) и бессывороточной средой DMEM добавляли 2,7-дихлордигидрофлюоресцеин диацетат до конечной концентрации 10 мкМ и инкубировали в течение 30 мин. Интенсивность флуоресцеина была измерена на планшетном спектрофлуориметре PHERAstar FS при λ_{ex} = 485 нм и λ_{em} = 518 нм. Результаты получены в трех независимых экспериментах и показаны как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка. За 100% принимали выживаемость клеток в присутствии 6-OHDA.

3.2.7.5 Определение цитопротективной активности в модели β -амилоид-индуцированной токсичности

Клетки нейробластомы мыши Neuro2a вносили в 96-луночный планшет в концентрации 1×10^3 клеток на лунку. Рекомбинантный пептид добавляли в концентрации 10 мкМ и через 1 ч добавляли β -амилоид в конечной концентрации 25 мкМ. Затем клетки инкубировали 24 ч при 37 °C и 5% CO₂. Для оценки жизнеспособности клеток использовали МТТ-тест, как описано выше. Результаты получены в трех независимых экспериментах и показаны как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка.

Заключение

В ядовитом секрете актиний рода *Heteractis* пептиды Кунитц-типа представлены в виде комбинаторной библиотеки, образованной четырьмя группами высокоомологичных изоформ (HCGS, HCRG, HCGG и HCIQ) с одинаковой N-концевой сигнальной последовательностью, но различающихся структурой как предшественника, так и зрелого пептида. Применение классических и современных методов молекулярной биологии, включая глубокое секвенирование ампликонов, для идентификации минорных транскриптов, позволило получить представление о разнообразии и распространенности изоформ нового подсемейства IQ-пептидов Кунитц-типа актиний рода *Heteractis*. Среди предшественников IQ-пептидов обнаружено четыре структурных варианта, различающихся наличием или отсутствием пропептида или его tandemных повторов, а также отсутствием C-концевой сигнальной последовательности. Важным отличием IQ-пептидов от других представителей комбинаторной библиотеки пептидов Кунитц-типа актиний рода *Heteractis* является наличие в структуре их предшественников пропептида с сайтом расщепления Lys-Arg, характерным для нейротоксинов и актинопоринов актиний. Появление последовательности, кодирующей пропептид, позволило предположить, что в процессе эволюции IQ-пептиды могли быть рекрутированы в состав ядовитого секрета в качестве токсинов.

Проведенные исследования позволили также получить представление о структурной организации генов IQ-пептидов, важной особенностью которых является присутствие второго интрона. Основываясь на данных филогенетического анализа, гены IQ- и GS-пептидов имеют монофилетическое происхождение, что, наряду с высокой идентичностью первого интрона и наличием структурного варианта предшественника без пропептида, указывает на принадлежность генов IQ-пептидов к мультигенному GS-семейству. Однако появление второго интрона и пропептид-кодирующей последовательности предполагает формирование отдельного IQ-подсемейства в составе GS-семейства, а существование ортологов IQ-пептидов в геномах *H. crispa* и *H. magnifica* – появление IQ-подсемейства до видовой дивергенции.

По-видимому, появление нового подсемейства IQ-пептидов со множеством изоформ, различающихся электростатическими свойствами, создает основу для взаимодействия не только с сериновыми протеазами, но и, возможно, с новыми мишенями, например, каналами или рецепторами. Исследование взаимодействия рекомбинантных IQ-пептидов Кунитц-типа с сериновыми протеазами показало, что пептиды являются не только ингибиторами трипсина, они также могут образовывать комплексы и с некоторыми другими сериновыми протеазами. Взаимодействие IQ-пептидов с ферментами, участвующими в воспалительных процессах, предполагает наличие у них потенциальной противовоспалительной активности. Впервые

показана способность пептидов Кунитц-типа морских анемонов снижать токсический эффект β -амилоида и 6-OHDA на нейрональные клетки и подавлять развитие окислительного стресса в результате снижения уровня АФК. Установлено, что IQ-пептиды не оказывают влияния на активность Kv1 каналов, что указывает на наличие иного нейропротективного механизма, не связанного с блокированием этих каналов. Поэтому дальнейшие исследования будут направлены на изучение механизма их цитопротективного действия.

Таким образом, разнообразие изоформ IQ-пептидов Кунитц-типа актиний рода *Heteractis*, их взаимодействие с различными сериновыми протеазами и проявление нейропротективной активности создает предпосылки к продолжению исследований этих пептидов, представляющих значительный интерес для медицины и фармакологии в качестве перспективных кандидатов для разработки и создания на их основе новых лекарственных препаратов.

Выводы

1. Впервые получены полноразмерные транскрипты, кодирующие не менее 24 изоформ IQ-пептидов *Heteractis crispa* и восьми изоформ IQ-пептидов *Heteractis magnifica*. Основные изоформы НМІQ идентичны таковым НСІQ.
2. Установлено четыре структурных варианта предшественников IQ-пептидов: 1) содержащих пропептид; 2) содержащих тандемный повтор пропептида; 3) не содержащих пропептид; 4) не содержащих С-концевого участка сигнального пептида. Обнаружено, что пропептид в структуре предшественников IQ-пептидов имеет сайт расщепления Lys-Arg, характерный для нейро- и пороформирующих токсинов актиний.
3. Показано, что гены IQ-пептидов состоят из трех экзонов, разделенных двумя интронами. Установлено, что гены IQ-пептидов принадлежат мультигенному GS-семейству и формируют отдельное подсемейство генов.
4. Разработаны эффективные системы рекомбинантной продукции IQ-пептидов *Heteractis crispa* и *Heteractis magnifica* в клетках *Escherichia coli*. Установлено, что рекомбинантные IQ-пептиды обладают выраженной пространственной структурой, сформированной в результате корректного фолдинга, с практически одинаковым содержанием элементов вторичной структуры и высокой термостабильностью.
5. Определены константы ингибирования трипсина рекомбинантными IQ-пептидами, значения которых варьируют в диапазоне от 10^{-8} до 10^{-7} М.
6. Установлено, что НСІQ2с1 и НМІQ3с1 взаимодействуют с трипсином, α -химотрипсином, калликреином, эластазой нейтрофилов человека и катепсином G (только НСІQ2с1), тогда как НСІQ4с7 образует комплексы только с трипсином и эластазой нейтрофилов человека. Константы диссоциации комплексов варьируют в диапазоне значений от 10^{-10} до 10^{-7} М. Показано, что в реакцию образования комплексов НСІQ2с1 с трипсином и α -химотрипсином существенный вклад вносит энтропийный фактор.
7. Показано, что НСІQ2с1 и НСІQ4с7 ингибируют цитотоксическое действие β -амилоида и 6-гидроксидофамина на клетки нейробластомы мыши, тогда как НМІQ3с1 проявляет защитный эффект только в отношении β -амилоида. Цитопротективный эффект НСІQ2с1 на клетки, обработанные 6-гидроксидофамином, является дозо-зависимым и сопровождается снижением уровня АФК. Цитопротективный эффект пептидов не связан с их взаимодействием с потенциал-зависимыми калиевыми каналами 1-го типа.

Список сокращений и условных обозначений

а.о. – аминокислотный остаток

АП – аминокислотная последовательность

АФК – активные формы кислорода

дНТФ – дезоксинуклеотид-трифосфат

ИЛ – интерлейкин

ИПТГ – изопропил- β -D-тиогалактозид

КД – спектроскопия кругового дихроизма

ЛПС – липополисахарид

МАЛДИ-ВП-МС (Matrix Assisted Laser Desorbition/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) –
времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной
десорбцией/ионизацией

МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид

НП – нуклеотидная последовательность

н.п. – пары нуклеотидов

ОФ ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

ПААГ – полиакриламидный гель

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ТФУ – трифторуксусная кислота

ЭНЧ – эластаза нейтрофилов человека

AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolePropionic Acid Receptor) – ионотропный
рецептор глутамата, активируемый АМРА

BNPNA – п-нитроанилид N-бензоил-D,L-аргинина

BPTI (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor) – бычий панкреатический ингибитор трипсина

^1H ЯМР – ядерный магнитный резонанс на ядрах атома водорода

K_A – константа ассоциации

k_a – константа скорости ассоциации

K_D – константа диссоциации

k_d – константа скорости диссоциации

K_i – константа ингибирования

K_v – потенциал-зависимый калиевый канал

МРТР – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин

NGS (New Generation Sequencing) – секвенирование нового поколения

NMDAR (N-Metyl-D-Aspartate Receptor) – ионотропный рецептор глутамата, селективно связывающий N-метил-D-аспартат

P1 – ключевой остаток реактивного сайта пептида Кунитц-типа

P1' – остаток реактивного сайта после положения P1

TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1) – канал переменного рецепторного потенциала, активируемый ваниллоидами, тип 1

Trx – тиоредоксин

6-OHDA – 6-гидроксидофамин

Список литературы

1. Ranasinghe S., McManus D.P. Structure and function of invertebrate Kunitz serine protease inhibitors // *Dev. Comp. Immunol.* 2013. V. 39, No 3. P. 219–227.
2. База данных Merops [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ebi.ac.uk/merops/>.
3. Kunitz M., Northrop J.H. Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, a trypsin inhibitor, and an inhibitor-trypsin compound // *J. Gen. Physiol.* 1936. V. 19, No 6. P. 991–1007.
4. Laskowski M. Protein Inhibitors // *Nature.* 1969. V. 223. P. 426–426.
5. Pritchard L., Dufton M.J. Evolutionary trace analysis of the Kunitz/BPTI family of proteins: Functional divergence may have been based on conformational adjustment // *J. Mol. Biol.* 1999. V. 285, No 4. P. 1589–1607.
6. Bayrhuber M. et al. Conkunitzin-S1 is the first member of a new Kunitz-type neurotoxin family: Structural and functional characterization // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280, No 25. P. 23766–23770.
7. You D. et al. The first gene-encoded amphibian neurotoxin // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284, No 33. P. 22079–22086.
8. Zhao R. et al. SdPI, the first functionally characterized Kunitz-type trypsin inhibitor from scorpion venom // *PLoS One.* 2011. V. 6, No 11. P. e27548.
9. Chen Z. et al. Genomic and structural characterization of Kunitz-type peptide LmKTT-1a highlights diversity and evolution of scorpion potassium channel toxins // *PLoS One.* 2013. V. 8, No 4. P. e60201.
10. Wlodawer A. et al. Structure of bovine pancreatic trypsin inhibitor. Results of joint neutron and X-ray refinement of crystal form II // *J. Mol. Biol.* 1984. V. 180, No 2. P. 301–329.
11. Korukottu J. et al. Fast high-resolution protein structure determination by using unassigned NMR data // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2007. V. 46, No 7. P. 1176–1179.
12. Antuch W. et al. The NMR solution structure of a Kunitz-type proteinase inhibitor from the sea anemone *Stichodactyla helianthus* // *Eur. J. Biochem.* 1993. V. 212, No 3. P. 675–684.
13. Berndt K.D., Güntert P., Wüthrich K. Nuclear magnetic resonance solution structure of dendrotoxin K from the venom of *Dendroaspis polylepis polylepis* // *J. Mol. Biol.* 1993. V. 234, No 3. P. 735–750.
14. Lancelin J.M. et al. Proteinase inhibitor homologues as potassium channel blockers // *Struct. Biol.* 1994. V. 1, No 4. P. 246–250.
15. Kwong P.D. et al. Structure of β 2-bungarotoxin: potassium channel binding by Kunitz modules and targeted phospholipase action // *Structure.* 1995. V. 3, No 10. P. 1109–1119.
16. Chen C. et al. Solution structure of a Kunitz-type chymotrypsin inhibitor isolated from the Elapid snake *Bungarus fasciatus* // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276, No 48. P. 45079–45087.
17. Peng K., Lin Y., Liang S.P. Nuclear magnetic resonance studies on Huwentoxin-XI from the Chinese bird spider *Ornithoctonus huwena*: ^{15}N labeling and sequence-specific ^1H , ^{15}N nuclear magnetic resonance assignments // *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* 2006. V. 38, No 7. P. 457–466.
18. Karbat I. et al. Pore-modulating toxins exploit inherent slow inactivation to block K^+ channels // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2019. V. 116, No 37. P. 18700–18709.
19. Gilquin B. et al. Conformational and functional variability supported by the BPTI fold: Solution structure of the Ca^{2+} channel blocker calcicludine // *Proteins Struct. Funct. Genet.* 1999. V. 34, No 4. P. 520–532.

20. Skarzyński T. Crystal structure of alpha-dendrotoxin from the green mamba venom and its comparison with the structure of bovine pancreatic trypsin inhibitor. // J. Mol. Biol. 1992. V. 224, No 3. P. 671–683.
21. Millers E.K.I. et al. Crystal structure of textilinin-1, a Kunitz-type serine protease inhibitor from the venom of the Australian common brown snake (*Pseudonaja textilis*) // FEBS J. 2009. V. 276, No 11. P. 3163–3175.
22. Garcia-Fernandez R. et al. Structural insights into serine protease inhibition by a marine invertebrate BPTI Kunitz-type inhibitor // J. Struct. Biol. 2012. V. 180, No 2. P. 271–279.
23. Millers E.K.I. et al. The structure of human microplasmin in complex with textilinin-1, an aprotinin-like inhibitor from the Australian brown snake // PLoS One. 2013. V. 8, No 1. P. e54104.
24. Krowarsch D. et al. Canonical protein inhibitors of serine proteases // Cell. Mol. Life Sci. 2003. V. 60, No 11. P. 2427–2444.
25. Krowarsch D. et al. Structure-function relationships in serine protease – bovine pancreatic trypsin inhibitor interaction // Protein Pept. Lett. 2005. V. 12, No 5. P. 403–407.
26. Krowarsch D. et al. Interscaffolding additivity: Binding of P1 variants of bovine pancreatic trypsin inhibitor to four serine proteases // J. Mol. Biol. 1999. V. 289, No 1. P. 175–186.
27. Yuan C.H. et al. Discovery of a distinct superfamily of Kunitz-type toxin (KTT) from tarantulas // PLoS One. 2008. V. 3, No 10. P. e3414.
28. Сокотун И.Н. и др. Исследование взаимодействия ингибитора трипсина из актинии *Radianthus macrodactylus* с различными протеиназами // Биомедицинская химия. 2006. Т. 52, № 6. С. 595–600.
29. Gladkikh I. et al. Atypical reactive center Kunitz-type inhibitor from the sea anemone *Heteractis crispa* // Mar. Drugs. 2012. V. 10, No 7. P. 1545–1565.
30. Andreev Y.A. et al. Analgesic compound from sea anemone *Heteractis crispa* is the first polypeptide inhibitor of vanilloid receptor 1 (TRPV1) // J. Biol. Chem. 2008. V. 283, No 35. P. 23914–23921.
31. Козлов С.А. и др. Новые полипептидные компоненты с анальгетической активностью из морской анемоны *Heteractis crispa* // Биоорганическая химия. 2009. Т. 35, № 6. С. 789–798.
32. Andreev Y.A. et al. Polypeptide modulators of TRPV1 produce analgesia without hyperthermia // Mar. Drugs. 2013. V. 11, No 12. P. 5100–5115.
33. Monastyrnaya M. et al. Kunitz-Type peptide HCRG21 from the sea anemone *Heteractis crispa* is a full antagonist of the TRPV1 receptor // Mar. Drugs. 2016. V. 14, No 12. P. 229.
34. Harvey A.L. Twenty years of dendrotoxins // Toxicon. 2001. V. 39, No 1. P. 15–26.
35. Grzesiak A. et al. Substitutions at the P1' position BPTI strongly affect the association energy with serine proteinases // J. Mol. Biol. 2000. V. 301, No 1. P. 205–217.
36. Gasparini S. et al. Delineation of the functional site of α -dendrotoxin: The functional topographies of dendrotoxins are different but share a conserved core with those of other K_v1 potassium channel-blocking toxins // J. Biol. Chem. 1998. V. 273, No 39. P. 25393–25403.
37. Smith L.A. et al. Site-directed mutagenesis of dendrotoxin K reveals amino acids critical for its interaction with neuronal K^+ channels // Biochemistry. 1997. V. 36, No 25. P. 7690–7696.
38. Wang F.C. et al. Identification of residues in dendrotoxin K responsible for its discrimination between neuronal K^+ channels containing $K_v1.1$ and 1.2α subunits // Eur. J. Biochem. 1999. V. 263, No 1. P. 222–229.

39. Imredy J.P., MacKinnon R. Energetic and structural interactions between δ -dendrotoxin and a voltage-gated potassium channel // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 296, No 5. P. 1283–1294.
40. Mourão C.B.F., Schwartz E.F. Protease inhibitors from marine venomous animals and their counterparts in terrestrial venomous animals // *Mar. Drugs.* 2013. V. 11, No 6. P. 2069–2112.
41. Jouiaei M. et al. Ancient venom systems: A review on cnidaria toxins // *Toxins (Basel).* 2015. V. 7, No 6. P. 2251–2271.
42. Moran Y. et al. Neurotoxin localization to ectodermal gland cells uncovers an alternative mechanism of venom delivery in sea anemones // *Proc. R. Soc. B.* 2012. V. 279, No 1732. P. 1351–1358.
43. Reft A.J., Daly M. Morphology, distribution, and evolution of apical structure of nematocysts in hexacorallia // *J. Morphol.* 2012. V. 273, No 2. P. 121–136.
44. Honma T. et al. Novel peptide toxins from the sea anemone *Stichodactyla haddoni* // *Peptides.* 2008. V. 29, No 4. P. 536–544.
45. Yamaguchi Y. et al. Screening and cDNA cloning of K_v1 potassium channel toxins in sea anemones // *Mar. Drugs.* 2010. V. 8, No 12. P. 2893–2905.
46. Isaeva M.P. et al. A new multigene superfamily of Kunitz-type protease inhibitors from sea anemone *Heteractis crispa* // *Peptides.* 2012. V. 34. P. 88–97.
47. Cassoli J.S. et al. The proteomic profile of *Stichodactyla duerdeni* secretion reveals the presence of a novel O-linked glycopeptide // *J. Proteomics.* 2013. V. 87. P. 89–102.
48. Madio B., King G.F., Undheim E.A.B. Sea anemone toxins: A structural overview // *Mar. Drugs.* 2019. V. 17, No 6. P. 325.
49. Зыкова Т.А. и др. Аминокислотная последовательность трипсинового ингибитора IV из *Radianthus macrodactylus* // *Биоорганическая химия.* 1985. Т. 11, № 3. С. 293–301.
50. Сокотун И.Н. и др. Ингибитор сериновых протеиназ из актинии *Radianthus macrodactylus*: выделение и физико-химические свойства // *Биохимия.* 2007. Т. 33, № 4. С. 448–455.
51. Schweitz H. et al. Kalicludines and Kaliseptine. Two different classes of sea anemone toxins for voltage-sensitive K⁺ channels // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270, No 42. P. 25121–25126.
52. Kozlov S., Grishin E. The mining of toxin-like polypeptides from EST database by single residue distribution analysis. // *BMC Genomics.* 2011. V. 12, No 1. P. 88.
53. Delfin J. et al. Purification, characterization and of proteinase inhibitors from *Stichodactyla helianthus* // *Toxicon.* 1996. V. 34, No 11. P. 1367–1376.
54. Diaz J. et al. Purification and partial characterization of a novel proteinase inhibitor from the sea anemone *Stichodactyla helianthus* // *Toxicon.* 1998. V. 36, No 9. P. 1275–1276.
55. Madio B., Undheim E.A.B., King G.F. Revisiting venom of the sea anemone *Stichodactyla haddoni*: Omics techniques reveal the complete toxin arsenal of a well-studied sea anemone genus // *J. Proteomics.* 2017. V. 166. P. 83–92.
56. A photo marine [Electronic resource]. URL: <http://www.aphotomarine.com/>.
57. Prentis P.J., Pavasovic A., Norton R.S. Sea anemones: Quiet achievers in the field of peptide toxins // *Toxins (Basel).* 2018. V. 10, No 1. P. 36.
58. University of Hawaii at Manoa [Электронный ресурс]. URL: https://manoa.hawaii.edu/exploringourfluidearth/media_colorbox/3221/media_original/en.
59. Mukherjee A.K., Mackessy S.P., Dutta S. Characterization of a Kunitz-type protease inhibitor peptide (Rusvikunin) purified from *Daboia russelii russelii* venom // *Int. J. Biol. Macromol.* 2014.

- V. 67. P. 154–162.
60. Tasoulis T., Isbister G.K. A review and database of snake venom proteomes // *Toxins* (Basel). 2017. V. 9. P. 290.
 61. Laustsen A.H. et al. Unveiling the nature of black mamba (*Dendroaspis polylepis*) venom through venomomics and antivenom immunoprofiling: Identification of key toxin targets for antivenom development // *J. Proteomics*. 2015. V. 119. P. 126–142.
 62. Lauridsen L.P. et al. Toxicovenomics and antivenom profiling of the Eastern green mamba snake (*Dendroaspis angusticeps*) // *J. Proteomics*. 2016. V. 136. P. 248–261.
 63. Mukherjee A.K., Kalita B., Mackessy S.P. A proteomic analysis of Pakistan *Daboia russelii russelii* venom and assessment of potency of Indian polyvalent and monovalent antivenom // *J. Proteomics*. 2016. V. 144. P. 73–86.
 64. Kuhn-Nentwig L., Stöcklin R., Nentwig W. Venom composition and strategies in spiders. is everything possible? // *Advances in Insect Physiology*. 2011. V. 40. 1–86 p.
 65. Pineda S.S. et al. ArachnoServer 3.0: An online resource for automated discovery, analysis and annotation of spider toxins // *Bioinformatics*. 2018. V. 34, No 6. P. 1074–1076.
 66. Cheng T.C. et al. Identification and characterization of toxins in the venom gland of the Chinese bird spider, *Haplopelma hainanum*, by transcriptomic analysis // *Insect Sci*. 2016. V. 23, No 3. P. 487–499.
 67. Wan H. et al. A spider-derived Kunitz-type serine protease inhibitor that acts as a plasmin inhibitor and an elastase inhibitor // *PLoS One*. 2013. V. 8, No 1. P. 1–8.
 68. Fet V. et al. Catalog of the scorpions of the world (1758-1998). The New York Entomological Society, 2000. 690 p.
 69. Inceoglu B. et al. One scorpion, two venoms: Prevenom of *Parabuthus transvaalicus* acts as an alternative type of venom with distinct mechanism of action // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2003. V. 100, No 3. P. 922–927.
 70. Ma Y. et al. Extreme diversity of scorpion venom peptides and proteins revealed by transcriptomic analysis: Implication for proteome evolution of scorpion venom arsenal // *J. Proteomics*. 2012. V. 75, No 5. P. 1563–1576.
 71. Hakim M.A., Yang S. Discoveries of serine protease inhibitors from scorpions // *J. Proteomics Bioinform*. 2016. V. 9, No 4. P. 101–106.
 72. Schwartz E.F. et al. Transcriptome analysis of the venom gland of the Mexican scorpion *Hadrurus gertschi* (Arachnida: Scorpiones) // *BMC Genomics*. 2007. V. 8. P. 119.
 73. Zhang L. et al. Unique diversity of the venom peptides from the scorpion *Androctonus bicolor* revealed by transcriptomic and proteomic analysis // *J. Proteomics*. 2015. V. 128. P. 231–250.
 74. Ruiming Z. et al. Comparative venom gland transcriptome analysis of the scorpion *Lychas mucronatus* reveals intraspecific toxic gene diversity and new venomous components // *BMC Genomics*. 2010. V. 11, No 1. P. 452.
 75. Calderon L. de A., Stabeli R.G. Anuran amphibians: a huge and threatened factory of a variety of active peptides with potential nanobiotechnological applications in the face of amphibian decline // *Changing diversity in changing environment* / ed. Grillo O., Venora G. Rijeka, Croatia: InTech, 2011. P. 211–242.
 76. Xi X. et al. A review on bradykinin-related peptides isolated from amphibian skin secretion // *Toxins* (Basel). 2015. V. 7, No 3. P. 951–970.
 77. Bevins C.L., Zasloff M. Peptides from frog skin // *Annu. Rev. Biochem*. 1990. V. 59, No 1. P.

395–414.

78. Conlon J.M., Kim J.B. A protease inhibitor of the Kunitz family from skin secretions of the tornato frog, *Dyscophus guineti* (Microhylidae) // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000. V. 279, No 3. P. 961–964.
79. Ali M.F. et al. Antimicrobial peptides and protease inhibitors in the skin secretions of the crawfish frog, *Rana areolata* // Biochim. Biophys. Acta. 2002. V. 1601. P. 55–63.
80. Gebhard L.G. et al. A Kazal prolyl endopeptidase inhibitor isolated from the skin of *Phyllomedusa sauvagii* // Eur. J. Biochem. 2004. V. 271, No 11. P. 2117–2126.
81. Song G. et al. HV-BBI-A novel amphibian skin Bowman-Birk-like trypsin inhibitor // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2008. V. 372, No 1. P. 191–196.
82. Wu J. et al. Proteomic analysis of skin defensive factors of tree frog *Hyla simplex* // J. Proteome Res. 2011. V. 10, No 9. P. 4230–4240.
83. Wang H. et al. Functional peptidomics of amphibian skin secretion: A novel Kunitz-type chymotrypsin inhibitor from the African hyperoliid frog, *Kassina senegalensis* // Biochimie. 2012. V. 94, No 3. P. 891–899.
84. Hernández-Pérez J. et al. Identification of arenin, a novel kunitz-like polypeptide from the skin secretions of *Dryophytes arenicolor* // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19, No 11. P. 3644.
85. Terlau H., Olivera B.M. Conus venoms: A rich source of novel ion channel-targeted peptides // Physiol. Rev. 2004. V. 84, No 1. P. 41–68.
86. Olivera B.M. Conus venom peptides: Reflections from the biology of clades and species // Annu. Rev. Ecol. Syst. 2002. V. 33. P. 25–47.
87. Norton R.S., Olivera B.M. Conotoxins down under // Toxicon. 2006. V. 48, No 7. P. 780–798.
88. Lewis R.J. et al. Conus venom peptide pharmacology // Pharmacol. Rev. 2012. V. 64, No 2. P. 259–298.
89. Elliger C.A. et al. Diversity of conotoxin types from *Conus californicus* reflects a diversity of prey types and a novel evolutionary history // Toxicon. 2011. V. 57, No 2. P. 311–322.
90. Dutertre S. et al. Evolution of separate predation-and defence-evoked venoms in carnivorous cone snails // Nat. Commun. 2014. V. 5. P. 3521.
91. Kumar P.S., Kumar D.S., Umamaheswari S. A perspective on toxicology of *Conus* venom peptides // Asian Pac. J. Trop. Med. 2015. V. 8, No 5. P. 337–351.
92. Peng C. et al. High-throughput identification of novel conotoxins from the Chinese tubular cone snail (*Conus betulinus*) by multi-transcriptome sequencing // Giga Sci. 2016. V. 5, No 1. P. 1–14.
93. Abalde S. et al. Conotoxin diversity in *Chelyconus ermineus* (Born, 1778) and the convergent origin of piscivory in the atlantic and indo-pacific cones // Genome Biol. Evol. 2018. V. 10, No 10. P. 2643–2662.
94. Pardos-Blas J.R. et al. Conotoxin diversity in the venom gland transcriptome of the magician's cone, *Pionoconus magus* // Mar. Drugs. 2019. V. 17, No 10. P. 553.
95. Župunski V., Kordiš D. Strong and widespread action of site-specific positive selection in the snake venom Kunitz/BPTI protein family // Sci. Rep. 2016. V. 6. P. 37054.
96. Masci P.P. et al. Textilinins from *Pseudonaja textilis textilis*. Characterisation of two novel plasmin inhibitors which inhibit bleeding in an animal model // Fibrinolysis and Proteolysis. 2000. V. 11. P. 385–393.
97. Župunski V., Kordiš D., Gubenšek F. Adaptive evolution in the snake venom Kunitz/BPTI protein

- family // FEBS Lett. 2003. V. 547. P. 131–136.
98. Cheng Y.C., Wang J.J., Chang L. Sen. B chain is a functional subunit of β -bungarotoxin for inducing apoptotic death of human neuroblastoma SK-N-SH cells // *Toxicon*. 2008. V. 51, No 2. P. 304–315.
 99. Cheng Y.C., Yan F.J., Chang L. Sen. Taiwan cobra chymotrypsin inhibitor: Cloning, functional expression and gene organization // *Biochim. Biophys. Acta*. 2005. V. 1747, No 2. P. 213–220.
 100. Cheng Y.C. et al. Divergence of genes encoding B chains of β -bungarotoxins // *Toxicon*. 2006. V. 47, No 3. P. 322–329.
 101. Chang L. sen et al. Genetic organization of *Bungarus multicinctus* protease inhibitor-like proteins // *Toxicon*. 2008. V. 51, No 8. P. 1490–1495.
 102. St. Pierre L. et al. Common evolution of waprin and kunitz-like toxin families in Australian venomous snakes // *Cell. Mol. Life Sci*. 2008. V. 65, No 24. P. 4039–4054.
 103. Doley R. et al. The gene structure and evolution of ku-wap-fusin (Kunitz waprin fusion protein), a novel evolutionary intermediate of the Kunitz serine protease inhibitors and waprins from *Sistrurus catenatus* (Massasauga Rattlesnake) venom glands // *Open Evol. J*. 2010. V. 4, No 1. P. 31–41.
 104. Vincent J.P., Lazdunski M. Trypsin-pancreatic trypsin inhibitor association. Dynamics of the interaction and role of disulfide bridges // *Biochemistry*. 1972. V. 11, No 16. P. 2967–2977.
 105. Filippovich I. et al. A family of textilinin genes, two of which encode proteins with antihemorrhagic properties // *Br. J. Haematol*. 2002. V. 119, No 2. P. 376–384.
 106. Chatrath S.T. et al. Identification of novel proteins from the venom of a cryptic snake *Drysdalia coronoides* by a combined transcriptomics and proteomics approach // *J. Proteome Res*. 2011. V. 10, No 2. P. 739–750.
 107. Inagaki H. et al. Functional characterization of Kunitz-type protease inhibitor Pr-mulgins identified from New Guinean *Pseudechis australis* // *Toxicon*. 2012. V. 59, No 1. P. 74–80.
 108. Nakashima K. et al. Accelerated evolution in the protein-coding regions is universal in crotalinae snake venom gland phospholipase A2 isozyme genes. 1995. V. 92. P. 5605–5609.
 109. Ohno M. et al. Molecular evolution of snake toxins: is the functional diversity of snake toxins associated with a mechanism of accelerated evolution? // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol*. 1997. V. 59. P. 307–364.
 110. Chang L. Sen, Lin S.K., Chung C. Molecular cloning and evolution of the genes encoding the precursors of Taiwan cobra cardiotoxin and cardiotoxin-like basic protein // *Biochem. Genet*. 2004. V. 42. P. 429–440.
 111. Benishin C.G. et al. Four polypeptide components of green mamba venom selectively block certain potassium channels in rat brain synaptosomes. // *Mol. Pharmacol*. 1988. V. 34, No 2. P. 152–159.
 112. Sigle R., Hackett M., Aird S.D. Primary structures of four trypsin inhibitor E homologs from venom of *Dendroaspis angusticeps*: Structure-function comparisons with other dendrotoxin homologs // *Toxicon*. 2002. V. 40, No 3. P. 297–308.
 113. Shipolini R.A., Banks B.E.C. The amino-acid sequence of a polypeptide from the venom of *Dendroaspis viridis* // *Eur. J. Biochem*. 1974. V. 49, No 2. P. 399–405.
 114. Strydom D.J. Protease inhibitors as snake venom toxins // *Nature*. 1973. V. 243, No 124. P. 88–89.
 115. Strydom D.J. Snake Venom Toxins. Purification and properties of low-molecular-weight polypeptides of *Dendroaspis polylepis polylepis* (black mamba) venom // *Eur. J. Biochem*. 1976.

- V. 69. P. 169–176.
116. Harvey A.L., Anderson A.J. Dendrotoxins: Snake toxins that block potassium channels and facilitate neurotransmitter release // *Pharmacol. Ther.* 1985. V. 31. P. 33–55.
 117. Cardle L., Dufton M.J. Foci of amino acid residue conservation in the 3D structures of the Kunitz BPTI proteinase inhibitors: How do variants from snake venom differ? // *Protein Eng.* 1997. V. 10, No 2. P. 131–136.
 118. Kondo K., Hiroko I., Narita K. Amino from in the B chains *Bungarus multicinctus* venom. The amino acid substitutions in the B chains // *J. Biochem.* 1982. V. 91, No 5. P. 1519–1530.
 119. Chu C.C., Li S.H., Chen Y.H. Resolution of isotoxins in the β -bungarotoxin family // *J. Chromatogr. A.* 1995. V. 694, No 2. P. 492–497.
 120. Wu P.F., Chang L. Sen. Genetic organization of A chain and B chain of β -bungarotoxin from taiwan banded krait (*Bungarus multicinctus*): A chain genes and B chain genes do not share a common origin // *Eur. J. Biochem.* 2000. V. 267, No 15. P. 4668–4675.
 121. Wu P.F. et al. Cloning and functional expression of B chains of β -bungarotoxins from *Bungarus multicinctus* (Taiwan banded krait) // *Biochem. J.* 1998. V. 334, No 1. P. 87–92.
 122. Sintsova O. et al. Peptide fingerprinting of the sea anemone *Heteractis magnifica* mucus revealed neurotoxins, Kunitz-type proteinase inhibitors and a new β -defensin α -amylase inhibitor // *J. Proteomics.* 2018. V. 173. P. 12–21.
 123. Чаусова В.Е. Полипептиды Кунитц-типа актинии *Heteractis crispa*: структура, функция и причины многообразия изоформ. Владивосток: дис. канд. хим. наук 02.00.10, 2012. 128 с.
 124. Gladkikh I. et al. New Kunitz-type HCRG polypeptides from the sea anemone *Heteractis crispa* // *Mar. Drugs.* 2015. V. 13, No 10. P. 6038–6063.
 125. Jiang L. et al. Genomic organization and cloning of novel genes encoding toxin-like peptides of three superfamilies from the spider *Orinithoctonus huwena*. 2008. V. 29. P. 1679–1684.
 126. Kozlov S. et al. A novel strategy for the identification of toxinlike structures in spider venom // *Proteins Struct. Funct. Genet.* 2005. V. 59, No 1. P. 131–140.
 127. Kozlov S.A., Grishin E. V. The universal algorithm of maturation for secretory and excretory protein precursors // *Toxicon.* 2007. V. 49, No 5. P. 721–726.
 128. Li D. et al. Function and solution structure of hainantoxin-I, a novel insect sodium channel inhibitor from the Chinese bird spider *Selenocosmia hainana* // *FEBS Lett.* 2003. V. 555, No 3. P. 616–622.
 129. Liang S. An overview of peptide toxins from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena* Wang [= *Ornithoctonus huwena* (Wang)] // *Toxicon.* 2004. V. 43, No 5. P. 575–585.
 130. Chen Z.Y. et al. Hg1, novel peptide inhibitor specific for K_v1.3 channels from first scorpion Kunitz-type potassium channel toxin family // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287, No 17. P. 13813–13821.
 131. Stewart J., Gilly W.F. Piscivorous behavior of a temperate cone snail, *Conus californicus* // *Biol. Bull.* 2005. V. 209, No 2. P. 146–153.
 132. Morris R.H. Intertidal invertebrates of California / ed. Alto P. Stanford, 1980. 690 p.
 133. Cottrell G.A., Twarog B.M. Active factors in the venom duct of *Conus californicus* // *Br. J. Pharmacol.* 1972. V. 44. P. 365–366.
 134. Elliott E.J., Raftery M.A. Venom of marine snail *Conus californicus*: Biochemical studies of a cholinomimetic component // *Toxicon.* 1979. V. 17, No 3. P. 259–268.

135. Leychenko E. et al. Multigene family of pore-forming toxins from sea anemone *Heteractis crispa* // Mar. Drugs. 2018. V. 16. P. 183.
136. Fry B.G. et al. The toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. // Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2009. V. 10. P. 483–511.
137. Casewell N.R. et al. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms // Trends Ecol. Evol. 2013. V. 28, No 4. P. 219–229.
138. Kordiš D., Gubenšek F. Adaptive evolution of animal toxin multigene families // Gene. 2000. V. 261, No 1. P. 43–52.
139. Kohn A.J., Nybakken J.W. Ecology of *Conus* on eastern Indian Ocean fringing reefs: Diversity of species and resource utilization // Mar. Biol. 1975. V. 29, No 3. P. 211–234.
140. Kaas Q., Westermann J.C., Craik D.J. Conopeptide characterization and classifications: An analysis using ConoServer // Toxicon. 2010. V. 55, No 8. P. 1491–1509.
141. Wu Y. et al. Molecular evolution and diversity of *Conus* peptide toxins, as revealed by gene structure and intron sequence analyses // PLoS One. 2013. V. 8, No 12. P. 1–11.
142. Casewell N.R. et al. Domain loss facilitates accelerated evolution and neofunctionalization of duplicate snake venom metalloproteinase toxin genes // Mol. Biol. Evol. 2011. V. 28, No 9. P. 2637–2649.
143. Kassell B. Bovine trypsin-kallikrein inhibitor (Kunitz inhibitor, Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor, polyvalent inhibitor from bovine organs) // Methods Enzymol. 1970. V. 19. P. 844–852.
144. Ascenzi P. et al. Binding of the bovine basic pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz inhibitor) to human and bovine factor Xa. Thermodynamic study // Biol. Chem. Hoppe. Seyler. 1990. V. 371. P. 389–393.
145. Ascenzi P. et al. Binding of the bovine basic pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz) to human Glu1-, Lys77-, Val442-, and Val561-plasmin: a comparative study // Biochim. Biophys. Acta. 1990. V. 1040. P. 134–136.
146. Fiorucci L. et al. Evidence for multiple interacting binding sites in bovine tryptase // FEBS Lett. 1995. V. 363. P. 81–84.
147. Guo C. et al. Trypsin and chymotrypsin inhibitor peptides from the venom of Chinese *Daboia russellii siamensis* // Toxicon. 2013. V. 63. P. 154–164.
148. Синцова О.В. и др. Противовоспалительная активность полипептида актинии *Heteractis crispa* // Биоорганическая химия. 2015. Т. 41, № 6. С. 657–663.
149. Синцова О.В. и др. Пептиды Кунитц-типа актинии *Heteractis crispa* -потенциальные противовоспалительные соединения // Биоорганическая химия. 2017. Т. 43, № 1. С. 105–112.
150. Cheng A.C., Tsai I.H. Functional characterization of a slow and tight-binding inhibitor of plasmin isolated from Russell's viper venom // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1840, No 1. P. 153–159.
151. Cheng A.C. et al. A novel heparin-dependent inhibitor of activated protein C that potentiates consumptive coagulopathy in Russell's viper envenomation // J. Biol. Chem. 2012. V. 287, No 19. P. 15739–15748.
152. Flight S.M. et al. Textilinin-1, an alternative anti-bleeding agent to aprotinin: Importance of plasmin inhibition in controlling blood loss // Br. J. Haematol. 2009. V. 145, No 2. P. 207–211.
153. Owen D.G. et al. The relative potencies of dendrotoxins as blockers of the cloned voltage-gated K⁺ channel, mK_v1.1 (MK-1), when stably expressed in Chinese hamster ovary cells // Br. J. Pharmacol. 1997. V. 120, No 6. P. 1029–1034.
154. Báez A. et al. α -Dendrotoxin inhibits the ASIC current in dorsal root ganglion neurons from rat //

- Neurosci. Lett. 2015. V. 606. P. 42–47.
155. Chen Z.Y. et al. Hg1, novel peptide inhibitor specific for K_v1.3 channels from first scorpion Kunitz-type potassium channel toxin family // J. Biol. Chem. 2012. V. 287, No 17. P. 13813–13821.
 156. Gladkikh I. et al. Kunitz-type peptides from the sea anemone *Heteractis crispa* demonstrate potassium channel blocking and anti-inflammatory activities // Biomedicines. 2020. V. 8. P. 473.
 157. García-Fernández R. et al. The Kunitz-type protein ShPI-1 inhibits serine proteases and voltage-gated potassium channels // Toxins (Basel). 2016. V. 8, No 4. P. 110.
 158. Schweitz H. et al. Calcicludine, a venom peptide of the Kunitz-type protease inhibitor family, is a potent blocker of high-threshold Ca²⁺ channels with a high affinity for L-type channels in cerebellar granule neurons // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1994. V. 91, No 3. P. 878–882.
 159. Stotz S.C., Spaetgens R.L., Zamponi G.W. Block of voltage-dependent calcium channel by the green mamba toxin calcicludine // J. Membr. Biol. 2000. V. 174, No 2. P. 157–165.
 160. Синцова О.В. и др. Пептидный блокатор ионного канала TRPV1 проявляет длительный анальгетический эффект в модели тепловой стимуляции // Докл. Акад. Наук. 2020. Т. 493, № 1. С. 423–426.
 161. Ciolek J. et al. Green mamba peptide targets type-2 vasopressin receptor against polycystic kidney disease // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2017. V. 114, No 27. P. 7154–7159.
 162. Wang Y., Chua K.L., Khoo H.E. A new cytolysin from the sea anemone, *Heteractis magnifica*: isolation, cDNA cloning and functional expression // Biochem. Biophys. Acta. 2000. V. 1478. P. 9–18.
 163. Pungertar J. et al. Sequence analysis of the cDNA encoding the precursor of equinatoxin V, a newly discovered hemolysin from the sea anemone *Actinia equina* // Biochim. Biophys. Acta. 1997. V. 1341, No 2. P. 105–107.
 164. Honma T. et al. Molecular cloning of an epidermal growth factor-like toxin and two sodium channel toxins from the sea anemone *Stichodactyla gigantea* // Biochim. Biophys. Acta. 2003. V. 1652, No 2. P. 103–106.
 165. Oliveira J.S., Fuentes-Silva D., King G.F. Development of a rational nomenclature for naming peptide and protein toxins from sea anemones // Toxicon. 2012. V. 60, No 4. P. 539–550.
 166. Tang X. et al. Molecular diversification of peptide toxins from the tarantula *Haplopelma hainanum* (*Ornithoctonus hainana*) venom based on transcriptomic, peptidomic, and genomic analyses // J. Proteome Res. 2010. V. 9. P. 2550–2564.
 167. Wong E.S.W. et al. SVM-based prediction of propeptide cleavage sites in spider toxins identifies toxin innovation in an Australian tarantula // PLoS One. 2013. V. 8, No 7. P. e66279.
 168. Bandyopadhyay P.K. et al. Conantokin-G precursor and its role in γ -carboxylation by a vitamin K-dependent carboxylase from a *Conus* snail // J. Biol. Chem. 1998. V. 273, No 10. P. 5447–5450.
 169. Buczek O., Olivera B.M., Bulaj G. Propeptide does not act as an intramolecular chaperone but facilitates protein disulfide isomerase-assisted folding of a Conotoxin precursor // Biochemistry. 2004. V. 43, No 4. P. 1093–1101.
 170. Kuhn-Nentwig L. et al. The dual prey-inactivation strategy of spiders—in-depth venom analysis of *Cupiennius salei* // Toxins (Basel). 2019. V. 11, No 3. P. 167.
 171. Honma T. et al. Molecular cloning of an epidermal growth factor-like toxin and two sodium channel toxins from the sea anemone *Stichodactyla gigantea* // Biochim. Biophys. Acta. 2003. V. 1652, No 2. P. 103–106.

172. Conticello S.G. et al. Position-specific codon conservation in hypervariable gene families // Trends Genet. 2000. V. 16, No 2. P. 57–59.
173. Василевский А.А., Козлов С.А., Гришин Е.В. Молекулярное разнообразие яда пауков // Успехи биологической химии. 2009. Т. 49. С. 211–274.
174. Agarwal A.K. et al. CA-Repeat polymorphism in intron 1 of HSD11B2: effects on gene expression and salt sensitivity // Hypertension. 2000. V. 36, No 2. P. 187–194.
175. Hui J. et al. Intronic CA-repeat and CA-rich elements: a new class of regulators of mammalian alternative splicing // EMBO J. 2005. V. 24, No 11. P. 1988–1998.
176. Conticello S.G. et al. Mechanisms for evolving hypervariability: The case of conopeptides // Mol. Biol. Evol. 2001. V. 18, No 2. P. 120–131.
177. Kozminsky-Atias A. et al. Assembling an arsenal, the scorpion way. // BMC Evol. Biol. 2008. V. 8, No 1. P. 333.
178. Olivera B.M. et al. Speciation of cone snails and interspecific hyperdivergence of their venom peptides. Potential evolutionary significance of introns // Ann N Y Acad Sci. 1999. V. 870. P. 223–237.
179. Chen Z., Bode W. Refined 2.5 Å X-ray crystal structure of the complex formed by porcine kallikrein A and the bovine pancreatic trypsin inhibitor // J. Mol. Biol. 1983. V. 164, No 2. P. 283–311.
180. Helland R. et al. The crystal structures of the complexes between bovine β -trypsin and ten P1 variants of BPTI // J. Mol. Biol. 1999. V. 287, No 13. P. 923–942.
181. Richter S. et al. webPIPSA: a web server for the comparison of protein interaction properties. // Nucleic Acids Res. 2008. V. 36. P. 276–280.
182. Béress L., Béress R., Wunderer G. Isolation and characterisation of three polypeptides with neurotoxic activity from *Anemonia sulcata* // FEBS Lett. 1975. V. 50, No 3. P. 311–314.
183. Petersen L.C. et al. Expression, purification and characterization of a Kunitz-type protease inhibitor domain from human amyloid precursor protein homolog // FEBS Lett. 1994. V. 338, No 1. P. 53–57.
184. Monastyrnaya M.M. et al. Biologically active polypeptides from the tropical sea anemone *Radianthus macrodactylus* // Toxicon. 2002. V. 40, No 8. P. 1197–1217.
185. Gil D.F. et al. Recombinant expression of ShPI-1A, a non-specific BPTI-Kunitz-type inhibitor, and its protection effect on proteolytic degradation of recombinant human miniprotinsulin expressed in *Pichia pastoris* // FEMS Yeast Res. 2011. V. 11, No 7. P. 575–586.
186. Valle A. et al. The multigene families of actinoporins (part II): Strategies for heterologous production in *Escherichia coli* // Toxicon. 2016. V. 118, No 455. P. 64–81.
187. Estrada-Gómez S. et al. Identifying different transcribed proteins in the newly described Theraphosidae *Pamphobeteus verdolaga* // Toxicon. 2017. V. 129. P. 81–88.
188. Berndt C., Lillig C.H., Holmgren A. Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding // Biochim. Biophys. Acta. 2008. V. 1783, No 4. P. 641–650.
189. Andreev Y.A. et al. Cyanogen bromide cleavage of proteins in salt and buffer solutions // Anal. Biochem. 2010. V. 407, No 1. P. 144–146.
190. Вакорина Т.И. и др. Конформационная стабильность ингибитора сериновых протеиназ InhVJ из актинии *Heteractis crispa* // Биоорганическая химия. 2011. Т. 1. С. 310–318.
191. Sasaki S.D. et al. An unexpected inhibitory activity of Kunitz-type serine proteinase inhibitor derived from *Boophilus microplus* trypsin inhibitor on cathepsin L // Biochem. Biophys. Res.

- Commun. 2006. V. 341, No 1. P. 266–272.
192. Alonso-del-Rivero M. et al. Tri-domain bifunctional inhibitor of metallocarboxypeptidases A and serine proteases isolated from marine annelid *Sabellastarte magnifica* // J. Biol. Chem. 2012. V. 287, No 19. P. 15427–15438.
 193. Табакмахер В.М. и др. Анальгетическое действие новых полипептидов Кунитц-типа актинии *Heteractis crispa* // Доклады Академии Наук. 2015. Т. 461, № 2. С. 232–235.
 194. Dixon M. The determination of enzyme inhibitor constants. // Biochem. J. 1953. V. 55, No 1. P. 170–171.
 195. Nguyen H.H. et al. Surface plasmon resonance: A versatile technique for biosensor applications // Sensors. 2015. V. 15, No 5. P. 10481–10510.
 196. Табакмахер В.М. Структурно-функциональные взаимосвязи полипептидов Кунитц-типа актинии *Heteractis crispa*. Владивосток: дис. канд. хим. наук 02.00.10, 2014. 140 с.
 197. Umeki S., Niki Y., Soejima R. Elastase/anti-elastase systems in pulmonary diseases.pdf // Am. J. Med. Sci. 1988. V. 296, No 2. P. 103–106.
 198. Tetley T.D. Proteinase imbalance: Its role in lung disease // Thorax. 1993. V. 48. P. 560–565.
 199. Sommerhoff C.P. et al. Neutrophil elastase and cathepsin G stimulate secretion from cultured bovine airway gland serous cells // J. Clin. Invest. 1990. V. 85, No 3. P. 682–689.
 200. Proud D., Kaplan A.P. Kinin formation: Mechanisms and role in inflammatory disorders // Annu. Rev. Immunol. 1988. V. 6. P. 49–83.
 201. Movat H.Z. Chemical mediators of the vascular phenomena of acute inflammation // Canad. Med. Ass. J. 1969. V. 101. P. 96–98.
 202. Stites W.E. Protein-protein interactions: Interface structure, binding thermodynamics, and mutational analysis // Chem. Rev. 1997. V. 97, No 5. P. 1233–1250.
 203. Dias V., Junn E., Mouradian M.M. The role of oxidative stress in Parkinson's Disease // J Park. Dis. 2013. V. 3, No 4. P. 461–491.
 204. McGeer P.L., McGeer E.G. The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases // Brain Res. Rev. 1995. V. 21, No 2. P. 195–218.
 205. Blesa J. et al. Classic and new animal models of Parkinson's disease // J. Biomed. Biotechnol. 2012. V. 2012. P. 845618.
 206. Drummond E., Wisniewski T. Alzheimer's disease: experimental models and reality // Acta Neuropathol. 2017. V. 133, No 2. P. 155–175.
 207. Snyder E.M. et al. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- β // Nat. Neurosci. 2005. V. 8, No 8. P. 1051–1058.
 208. Shankar G.M. et al. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid- β protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway // J. Neurosci. 2007. V. 27, No 11. P. 2866–2875.
 209. Shankar G.M., Walsh D.M. Alzheimer's disease: synaptic dysfunction and A β // Mol. Neurodegener. 2009. V. 4. P. 48.
 210. Yamazaki M., Chiba K., Satoh K. Neuro2a cell death induced by 6-hydroxydopamine is attenuated by Genipin // J. Heal. Sci. 2008. V. 54, No 6. P. 638–644.
 211. Liao Q. et al. Novel Kunitz-like peptides discovered in the zoanthid *Palythoa caribaeorum* through transcriptome sequencing // J. Proteome Res. 2018. V. 17, No 2. P. 891–902.

- 212.Redman P.T. et al. A vital role for voltage-dependent potassium channels in dopamine transporter-mediated 6-hydroxydopamine neurotoxicity // *Neuroscience*. 2006. V. 143. P. 1–6.
- 213.Chen X. et al. Potassium channels: a potential therapeutic target for Parkinson's Disease // *Neurosci. Bull.* 2017. V. 34, No 2. P. 341–348.
- 214.Villa C. et al. Potassium channels in the neuronal homeostasis and neurodegenerative pathways underlying Alzheimer's disease: An update // *Mech. Ageing Dev.* 2020. V. 185. P. 111197.
- 215.Taherian R., Ahmadi M.A. 4-Aminopyridine decreases MPTP-induced behavioral disturbances in animal model of Parkinson's disease // *Int. Clin. Neurosci. J.* 2015. V. 2, No 4. P. 142–146.
- 216.Peng Y. et al. Blockade of K_v1.3 channels ameliorates radiation-induced brain injury // *Neuro. Oncol.* 2014. V. 16, No 4. P. 528–539.
- 217.Tamura K. et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 // *Mol. Biol. Evol.* 2013. V. 30, No 12. P. 2725–2729.
- 218.База данных NCBI BLAST [Электронный ресурс]. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE=Proteins&PROGRAM=blastp&RUN_PSIBLAST=on.
- 219.Sambrook J., Russel, D W. Molecular cloning. A laboratory manual // Cold Spring Harbor Laboratory Press. 3rd ed. 2001. V. 1–3. 999 p.
- 220.Saitou N., Nei M. The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. Evol.* 1987. V. 4. P. 406–425.
- 221.Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap // *Ann. Stat.* 1985. V. 39, No 4. P. 783–791.
- 222.Zuckerandl E., Pauling L. Molecules as documents of evolutionary history // *J. Theor. Biol. Academic Press*, 1965. V. 8, No 2. P. 357–366.
- 223.Eswar N. et al. Comparative protein structure modeling using Modeller // *Curr. Protoc. Bioinforma.* 2006. V. 5. P. 5.6.1-5.6.37.
- 224.Pettersen E.F. et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis // *J. Comput. Chem.* 2004. V. 25, No 13. P. 1605–1612.
- 225.Laskowski R.A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures // *J. Appl. Crystallogr.* 1993. V. 26, No 2. P. 283–291.
- 226.Laskowski R.A. et al. AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR // *J. Biomol. NMR.* 1996. V. 8. P. 477–486.
- 227.Bas D.C., Rogers D.M., Jensen J.H. Very fast prediction and rationalization of pK_a values for protein-ligand complexes // *Proteins Struct. Funct. Genet.* 2008. V. 73, No 3. P. 765–783.
- 228.Andreev Y.A. et al. Cyanogen bromide cleavage of proteins in salt and buffer solutions // *Anal. Biochem.* 2010. V. 407, No 1. P. 144–146.
- 229.Hwang T.L., Shaka A.J. Water suppression that works. Excitation sculpting using arbitrary waveforms and pulsed field gradients // *J. Magn. Reson.* 1995. V. 112. P. 275–279.
- 230.Provencher S.W., Glöckner J. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. // *Biochemistry.* 1981. V. 20, No 1. P. 33–37.
- 231.Sreerama N., Woody R.W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set // *Anal. Biochem.* 2000. V. 287, No 2. P. 252–260.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи в рецензируемых журналах

1. **Кветкина А.Н.** Создание генетических экспрессионных конструкций для получения нового семейства полипептидов Кунитц-типа актиний // Вестник ДВО РАН. 2015. № 5. С. 141–144.
2. **Кветкина А.Н.,** Лейченко Е.В., Юрченко Е.А., Пислягин Е.А., Пеньёр С., Титгат Я., Исаева М.П., Аминин Д.Л., Козловская Э.П. Новый IQ-пептид Кунитц-типа актинии *Heteractis magnifica* обладает нейропротективной активностью в модели болезни Альцгеймера // Биоорганическая химия. 2018. Т. 44, № 4. С. 408–416.
3. **Кветкина А. Н.,** Калужский Л. А., Лейченко Е. В., Исаева М. П., Иванов А. С., Козловская Э. П. Новые мишени пептида Кунитц-типа актинии *Heteractis magnifica* // Докл. Акад. Наук. 2019. Т. 487, № 2. С. 108–111.
4. **Kvetkina A.,** Leychenko E., Chausova V., Zelepuga E., Chernysheva N., Guzev K., Pislyagin E., Yurchenko E., Menchinskaya E., Aminin D., Kaluzhskiy L., Ivanov A., Peigneur S., Tytgat J., Kozlovskaya E.P., Isaeva M.P. A new multigene HCIQ subfamily from the sea anemone *Heteractis crispa* encodes Kunitz-peptides exhibiting neuroprotective activity against 6-hydroxydopamine // Scientific Reports. 2020. V. 10. P. 4205. doi: 10.1038/s41598-020-61034-x.

Материалы конференций

5. **Кветкина А.Н.,** Чаусова В.Е., Лейченко Е.В., Исаева М.П., Козловская Э.П. Экзон-интронная структура генов, кодирующих ингибиторы Кунитц-типа актиний *Heteractis crispa* и *Stichodactyla mertensii*. Материалы VI Международной школы молодых ученых «Геномика и системная биология», г. Москва, 16-21 ноября 2014 г.: Тезисы докладов, с. 25.
6. **Kvetkina A.N.,** Chausova V.E., Sintsova O.V., Leychenko E.V., Isaeva M.P., Koslovskaya E.P. A new multigene family of Kunitz-type IQ-polypeptides from sea anemones: 40th FEBS congress “The Biochemical Basis of Life”, Berlin, Germany, July 4–9, 2015: abstrs // FEBS Journal. 2015. V. 282, suppl. 1. P. 141.
7. **Kvetkina A.N.,** Yurchenko E.A., Leychenko E.V., Isaeva M. P., Aminin D.L., Kozlovskaya E.P. The protective effect of *Heteractis crispa* HCIQ-Kunitz polypeptides in 6-OHDA-induced cytotoxicity model // “KORUS 2016”, Korea–Russia joint symposium “Together to effectively acting medicines”, Russia, Vladivostok, August 26-31, 2016: abstrs // Vladivostok, 2016. p. 29-30.
8. **Кветкина А.Н.,** Юрченко Е.А., Пислягин Е.А., Лейченко Е.В., Исаева М.П., Козловская Э.П. Новый IQ-пептид Кунитц-типа актинии *Heteractis magnifica*, проявляющий нейропротекторную активность в модели болезни Альцгеймера // XVI Всероссийская

молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии. Владивосток, 4-9 сентября 2017 г.: Тезисы докладов, с. 54.

9. Кветкина А.Н., Юрченко Е.А., Пислягин Е.А. Лейченко Е.В., Исаева М.П., Пак С. М., Козловская Э.П. Нейропротекторная активность пептидов Кунитц-типа актинии *Heteractis crispa* // 7-й Международный симпозиум «Химия и химическое образование», Владивосток, ДВФУ, 17-20 октября, 2017 г.: Тезисы докладов, с. 16.

10. Kvetkina A.N., Kaluzhskiy L.A., Leychenko E.V., Zelepuga E.A., Isaeva M.P., Ivanov A.S., Kozlovskaya E.P. The new *Heteractis magnifica* Kunitz-peptide interacts with serine proteases // 3rd International Symposium “Life Sciences”, Vladivostok, Russia, September, 4-8, 2018: abstrs // Vestnik FEB RAS. 2018. № 6 suppl. p. 90.

11. Kvetkina A., Leychenko E., Zelepuga E., Kaluzhskiy L., Ivanov A., Isaeva M., Kozlovskaya E. New Kunitz-peptide of *Heteractis crispa* with a propeptide in the precursor structure interacts with serine proteases and exhibit neuroprotective activity // 19th Congress of the European Section of the International Society of Toxinology, Yerevan, September 22-26, 2018: abstrs // Yerevan, p. 48-49. abstrs // Toxicon. 2019. V. 159, suppl. 1. p. S14.

12. Кветкина А.Н., Калужский Л.А., Пислягин Е.А., Менчинская Е.С., Иванов А.С., Аминин Д.Л., Исаева М.П., Лейченко Е.В. Взаимодействие с сериновыми протеазами и нейропротективная активность IQ пептидов Кунитц-типа актинии *Heteractis crispa* // XVII Всероссийская молодёжная онлайн школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии, ТИБОХ ДВО РАН, Владивосток, 7–10 сентября, 2020 г.: Тезисы докладов, с. 16.