

На правах рукописи



Синцова Оксана Владимировна

Пептиды Кунитц-типа актиний семейства Stichodactylidae: разнообразие, структура и биологическая активность

03.01.04 – Биохимия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток – 2018

Работа выполнена в Тихоокеанском институте биоорганической химии
им. Г.Б. Елякова ДВО РАН

Научный руководитель:

доктор химических наук
Монастырняя Маргарита Михайловна

Официальные оппоненты:

Кратасюк Валентина Александровна
доктор биологических наук, профессор,
Сибирский федеральный университет,
заведующая кафедрой биофизики

Санина Нина Михайловна
доктор биологических наук, профессор,
Дальневосточный федеральный университет,
профессор кафедры биохимии, микробиологии и
биотехнологии

Ведущая организация:

Федеральный научный центр биоразнообразия
наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН,
г. Владивосток

Защита состоится «26» февраля 2019 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 005.005.01 при Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН по адресу: 690022, г. Владивосток, проспект 100 лет Владивостоку, 159, ТИБОХ ДВО РАН. Факс: (423) 231-40-50, e-mail: dissovet@piboc.dvo.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ТИБОХ ДВО РАН (г. Владивосток, проспект 100 лет Владивостоку, 159, ТИБОХ ДВО РАН, www.piboc.dvo.ru).

Автореферат разослан « » января 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, к.б.н.



Черников О.В.

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования. Поиск и создание молекулярных инструментов для исследования механизмов функционирования живых организмов в нормальном и патологическом состоянии – одна из актуальных задач биохимии. Установлено, что ядовитый секрет морских кишечнополостных, актиний, является перспективным источником разнообразных биологически активных пептидов, которые обладают значительным фармакологическим потенциалом. Одним из основных компонентов яда актиний являются пептиды структурного семейства Кунитца, экспрессирующиеся в организмах всех представителей животного мира и осуществляющие контроль активности протеиназ. Показано, что в ходе эволюции геномов ядовитых животных гены, кодирующие данные пептиды, претерпели множественную дупликацию, которая привела к образованию мультигенных семейств. Новые копии генов мутировали, и некоторые кодируемые ими пептиды (токсины Кунитц-типа) приобрели способность взаимодействовать с такими мишенями, как ионные каналы (K_v , Ca_v , Na_v , ASICs), ионотропные (TRPV1) и связанные с G-белками (AVPR2) рецепторы. Большинство токсинов Кунитц-типа проявляет остаточную способность ингибировать протеиназы, что позволяет относить их к полифункциональным пептидам. Многочисленные исследования показали, что протеиназы и ионные каналы являются ключевыми инструментами регуляции многих функций организма, первые – за счет сигналинга, опосредованного ограниченным протеолизом определенных субстратов, вторые – в результате изменения концентрации ионов внутри клеток. Воздействуя на эти биологические мишени можно влиять на ряд физиологических процессов, таких как воспаление, передача болевых сигналов, клеточный цикл, иммунный ответ и другие.

Многие аспекты биологической активности, проявляемой пептидами Кунитц-типа актиний, а также их экспрессии в организме-продуcente изучены недостаточно полно. Ранее было обнаружено, что пептиды Кунитц-типа актинии *Heteractis crispa* кодируются мультигенным семейством, насчитывающим более 70 представителей. Однако размер реально существующей комбинаторной библиотеки пептидов Кунитц-типа не известен, а биологическая активность большинства ее представителей еще не установлена. Современные биохимические, молекулярно-биологические и физико-химические подходы значительно облегчают и ускоряют исследование пептидного разнообразия, что способствует обнаружению новых биологически активных пептидов. Благодаря способности взаимодействовать с ключевыми мишенями патогенеза некоторых заболеваний пептиды Кунитц-типа, продуцируемые актиниями, могут найти применение в качестве лидерных соединений для создания на их основе новых фармакологических препаратов. В связи с этим изучение взаимосвязи их структуры и активности приобретает как теоретическое, так и практическое значение.

Цели и задачи. Представленная работа является частью исследований, проводимых в Лаборатории химии пептидов Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук, посвященных изучению структуры и функции биологически активных пептидов кишечнополостных.

Цель данной работы – исследование разнообразия, структуры и биологической активности пептидов Кунитц-типа актиний семейства Stichodactylidae.

Были поставлены следующие задачи:

1. Поиск и выделение пептидов Кунитц-типа из актиний *Heteractis magnifica* и *Heteractis crispa*, установление их аминокислотных последовательностей.
2. Получение рекомбинантных пептидов Кунитц-типа актиний *H. crispa* и *Stichodactyla mertensii*.
3. Определение трипсинингибирующей активности полученных нативных и рекомбинантных пептидов.
4. Электрофизиологическое исследование модулирующего действия пептидов на ионотропный рецептор TRPV1 и потенциал-зависимые калиевые каналы.
5. Изучение противовоспалительной активности пептидов на моделях *in vitro*.

Научная новизна. В результате проведенного протеомного анализа нейротоксической фракции ядовитого секрета актинии *Heteractis magnifica* впервые показано, что пептиды Кунитц-типа синтезируются в виде комбинаторной библиотеки, содержащей более 60 представителей. Установлено, что ингибиторы протеиназ Кунитц-типа являются главным компонентом ядовитого секрета наряду с нейро- и пороформирующими токсинами. Впервые установлены основные (мажорные) изоформы пептидов Кунитц-типа актинии *H. magnifica*, две из которых оказались идентичны пептидам из актинии *H. crispa*.

Из водного экстракта актинии *H. crispa* выделено два новых ингибитора сериновых протеиназ Кунитц-типа. Впервые обнаружено, что они не только ингибируют трипсин, но также блокируют потенциал-зависимые калиевые каналы млекопитающих и насекомых и являются, таким образом, полифункциональными пептидами.

Получено восемь рекомбинантных представителей дивергентных групп пептидов Кунитц-типа актиний семейства Stichodactylidae, среди них обнаружен первый полный пептидный антагонист рецептора TRPV1.

Впервые показано, что пептиды Кунитц-типа актиний семейства Stichodactylidae способны ингибировать синтез некоторых провоспалительных медиаторов и подавлять развитие окислительного стресса в ЛПС-активированных макрофагах, а также блокировать действие гистамина *in vitro*.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные в результате протеомного анализа ядовитого секрета актинии *H. magnifica* пептидные карты позволят проводить более корректную идентификацию пептидов в дальнейших транскриптомных/геномных исследованиях. Новые полифункциональные пептиды Кунитц-типа, модулирующие ионные каналы, могут найти применение в качестве инструмента исследования молекулярных основ функционирования потенциал-зависимых калиевых каналов или ионотропного рецептора TRPV1. Биологически активные пептиды Кунитц-типа актиний семейства Stichodactylidae перспективны в качестве прототипов фармакологических препаратов для лечения болевого синдрома и воспалительного процесса, сопровождающих многие заболевания.

Положения, выносимые на защиту:

1. Пептиды Кунитц-типа актинии *H. magnifica* синтезируются в виде комбинаторной библиотеки и являются одним из главных компонентов ядовитого секрета.
2. Основные (мажорные) изоформы пептидов Кунитц-типа *H. magnifica* идентичны таковым *H. crispa*.
3. Пептиды Кунитц-типа *H. crispa*, HCRG1, HCRG2 и HCRG21 ингибируют протеиназы и модулируют ионные каналы и являются, таким образом, полифункциональными.

4. Пептиды Кунитц-типа актиний семейства Stichodactylidae ингибируют синтез некоторых провоспалительных медиаторов, подавляют развитие окислительного стресса в ЛПС-активированных макрофагах и проявляют антигистаминное действие *in vitro*.

Апробация результатов и публикации. Результаты работы опубликованы в ведущих рецензируемых научных журналах (Биоорганическая химия, Marine Drugs, Journal of Proteomics) и представлены на VI Международной школе молодых ученых по молекулярной генетике «Геномика и системная биология» (Москва, Россия, 2014), 40th FEBS Congress «The Biochemical Basis of Life» (Берлин, Германия, 2015), VII Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Новосибирск, Россия, 2015), V съезде биохимиков России (Дагомыс, Россия, 2016), VII Международном симпозиуме «Химия и химическое образование» (Владивосток, Россия, 2017), 19-м Европейском токсикологическом конгрессе (EU-IST2018) (Ереван, Армения, 2018).

Автором опубликовано 11 работ по теме диссертации, включая 5 научных статей в изданиях из списка ВАК и 6 материалов конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 205 публикаций. Диссертация изложена на 100 страницах машинописного текста и содержит 10 таблиц и 39 рисунков.

Благодарности. Автор выражает благодарность научному руководителю, д.х.н. Монастырной М.М. за помощь, поддержку и ценные советы при выполнении и оформлении данной работы. Автор глубоко признателен за оказанную помощь в выполнении отдельных этапов работы сотрудникам ТИБОХ ДВО РАН: к.х.н. Лейченко Е.В., к.х.н. Гладких И.Н., к.м.н. Исаевой М.П., к.х.н. Чаусовой В.Е., к.ф.-м.н. Зелепуга Е.А., к.х.н. Табакмахеру В.М., к.х.н. Анастюку С.Д., к.б.н. Черникову О.В., к.б.н. Юрченко Е.А., к.б.н. Пислягину Е.А., к.б.н. Менчинской Е.С., д.б.н. Аминину Д.Л., к.б.н. Кривошапко О.Н., н.с. Ким Н.Ю., м.н.с. Гузеву К.В., а также сотрудникам Лёвенского католического университета (Бельгия), докторам Титгату Я. и Пеньеру С., сотруднику отделения биотехнологии и животноводства университета г. Илань (Тайвань), доктору Хуа К.-Ф. Автор выражает благодарность заведующему лабораторией химии пептидов, д.х.н. Козловской Э.П. за ценные замечания, рекомендации и поддержку, оказанные при выполнении и оформлении данной работы.

Список сокращений и условных обозначений

А.о. – аминокислотный остаток; АП – аминокислотная последовательность; АФК – активные формы кислорода; БПТИ (BPTI, апротинин) – бычий панкреатический ингибитор трипсина; ИЛ – интерлейкин; ЛПС – липополисахарид бактерий; МС – масс-спектрометрия; НП – нуклеотидная последовательность; н.п. – пары нуклеотидов; ОФ ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ФНО- α – фактор некроза опухоли- α ; $[Ca^{2+}]_i$ – внутриклеточная концентрация ионов кальция; Ca_v – потенциал-зависимый кальциевый канал; EC_{50} – полумаксимальная эффективная концентрация; iNOS – индуцируемая NO-синтаза; IC_{50} – концентрация полумаксимального ингибирования; K_i – константа ингибирования; K_v – потенциал-зависимый калиевый канал; Na_v – потенциал-зависимый натриевый канал; NO – оксид азота (II); P1 – ключевой остаток реактивного сайта ингибитора Кунитц-типа; PPA – свиная панкреатическая α -амилаза; TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1) – ваниллоидный рецептор 1. В описании под выравниваниями АП в круглых скобках, после названия пептида, указан его номер в базе данных UniProt, например BPTI (P00974).

Основное содержание работы

Протеомный анализ ядовитого секрета актинии *H. magnifica*

Актиния *H. magnifica* широко распространена в водах Тихого и Индийского океана. Ранее было показано, что ее ядовитый секрет обладает противоопухолевой активностью, а из экстракта цельного организма было выделено и охарактеризовано несколько токсинов. Однако сведения о пептидах Кунитц-типа отсутствовали, а состав ядовитого секрета оставался мало изученным, поэтому в данной работе впервые проведен его протеомный анализ. Ядовитый секрет *H. magnifica*, полученный в результате механической стимуляции щупалец актинии, проявлял высокую нейротоксическую, гемолитическую и цитотоксическую активности, ингибировал трипсин и свиную панкреатическую α -амилазу (PPA). Так как большинство нейротоксинов и ингибиторов протеиназ является гидрофобными молекулами, а α -пороформирующие токсины – гидрофильными, на первом этапе их разделения была применена гидрофобная хроматография на полихrome-1 (рис. 1 А). Пептиды фракции, элюированные водой (пик 1), обладали гемолитической активностью, а 40% этанолом (пик 2) – проявляли высокую трипсинингибирующую и PPA-ингибирующую активности. Помимо этого, они были токсичны для клеток мышинной нейробластомы Neuro2a ($ED_{50} = 24,5 \pm 5,5$ мг/мл), а при введении крабам вызывали судороги и паралич, за которыми следовала их смерть. Так как α -пороформирующие токсины *H. magnifica* изучены достаточно полно (Wang et al., 2000, 2008), для дальнейшего исследования мы использовали только фракцию с нейротоксической активностью.

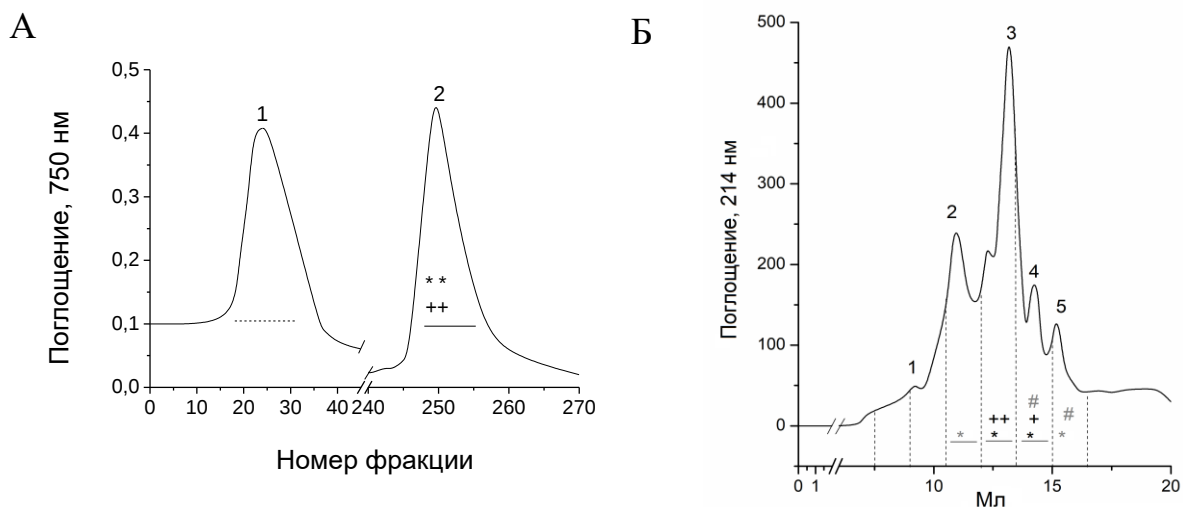


Рисунок 1 – (А) Гидрофобная хроматография пептидов ядовитого секрета *H. magnifica*. (Б) Гель-фильтрация пептидов гидрофобной фракции на колонке Superdex Peptide 10/30. Показаны границы объединения активных фракций. Гемолитическая активность показана пунктирной линией, трипсинингибирующая – сплошной линией, ингибирование PPA – (*), токсичность на крабах – (+), смерть крабов – (++), цитотоксическая активность на клетках Neuro2a – (#).

В результате гель-фильтрационной хроматографии пептидов этой фракции на колонке Superdex Peptide 10/30 было получено 5 фракций (рис. 1 Б). Фракции 2–4 обладали трипсинингибирующей активностью, 3 и 4 – PPA-ингибирующей активностью. Фракции 4 и 5 были токсичны для клеток нейробластомы Neuro2a, однако уменьшение жизнеспособности клеток в результате действия пептидов данных фракций составляло 7–20%, что оказалось намного меньше активности суммарной гидрофобной фракции. Данный факт свидетельствует о синергизме действия компонентов яда на нервные клетки млекопитающих. Ранее подобный эффект наблюдали при исследовании яда медузы *Chironex*

fleckeri. Пептиды фракций 3 и 4 оказались токсичны для крабов – введение фракции 3 приводило к их гибели, фракции 4 – вызывало паралич.

Для характеристики компонентов ядов различных животных широко используют современные хроматографические и масс-спектрометрические методы. В отличие от белкового электрофореза в полиакриламидном геле, ОФ ВЭЖХ позволяет эффективно разделять пептиды с молекулярной массой 2–20 кДа, преобладающие в ядах животных. Масс-спектрометрический анализ, в свою очередь, делает возможным установление точных молекулярных масс и позволяет идентифицировать изоформы пептидов, отличающихся точечными заменами аминокислотных остатков в последовательностях. Для конструирования пептидных карт нейротоксической фракции ядовитого секрета была проведена ОФ ВЭЖХ (носитель Nucleosil C₁₈) пептидов фракций 2–4, полученных геле-фильтрацией, и их масс-спектрометрический анализ (рис. 2). Данный подход использовали ранее другие научные группы при исследовании ядов актиний *Bunodosoma granulifera*, *Bunodosoma cangicum*, *Stichodactyla helianthus* и *Stichodactyla duerdeni* (Cassoli et al., 2013; Rodríguez et al., 2012; Zaharenko et al., 2008).

В результате разделения пептидов фракции 2 (рис. 1 Б) было получено 13 фракций, обозначенных 1а–13а (рис. 2 А, Б), времена удерживания которых находились в диапазоне 30–40 мин, что соответствовало 30–40% CH₃CN в элюирующем буферном растворе. С помощью МС анализа было обнаружено 39 пептидов с молекулярной массой от 4528 до 21701 Да. Наиболее часто встречались пептиды с массой в диапазоне 6000 – 7000 Да, соответствующие пептидам Кунитц-типа. Пептиды всех 13 фракций ингибировали трипсин.

При разделении пептидов фракции 3 (рис. 1 Б) был получен более сложный профиль элюции, насчитывающий 22 фракции (1б–22б) (рис. 2 В, Г), в диапазоне времен удерживания 25–45 мин (25–45% CH₃CN). Было обнаружено 106 пептидов с молекулярной массой от 2461 до 11400 Да. Наиболее часто встречались пептиды с массой 3000–4000, 5000–6500 и 8000–9000 Да, что типично для модуляторов ионных каналов (Na_v, K_v, ASICs, TRPV1), пептидов Кунитц-типа и ингибиторов α-амилазы. Было установлено, что девять фракций проявляет трипсинингибирующую активность (9б–16б и 19б), пять фракций (10б–14б) – РРА-ингибирующую.

В результате ОФ ВЭЖХ пептидов фракции 4 (рис. 1 Б) было получено 18 фракций (1в–18в) (рис. 2 Д, Е), содержащих 181 пептид с временами удерживания в диапазоне 25–52 минут (25–52% CH₃CN). Молекулярная масса пептидов составляла от 2591 до 13659 Да с наибольшей частотой 2000–4000 Да. Пять фракций (7в–10в и 12в) также проявляли трипсинингибирующую активность, но количество пептидов с молекулярной массой около 6000 Да было значительно меньшим, чем во фракциях 2 и 3. Одиннадцать фракций обладало РРА-ингибирующей активностью (7в–14в).

Всего было обнаружено 326 пептидов, исходя из времен удерживания и значений молекулярных масс. На основании данных МС анализа была проведена предварительная идентификация некоторых пептидов. Так, фракция 21б (рис. 2 В, Г) содержала пептид с молекулярной массой 5288 Да, идентичной массе RpII, модулятора потенциал-зависимых Na⁺ каналов (Schweitz et al., 1985). Секвенирование N-концевого фрагмента пептида (29 а.о.) подтвердило идентичность аминокислотной последовательности RpII. Фракция 10в (рис. 2 Д, Е) обладала высокой РРА-ингибирующей активностью, а молекулярная масса, соответствующая мажорному МС пику (4770 Да), была близка массе хелиантамида, ингибитора α-амилазы из актинии *S. helianthus* (4684 Да) (Tysoe et al., 2016). В результате повторной хроматографии пептидов фракции 10в был выделен высокоочищенный пептид,

магнификамид, обладающий РРА-ингибирующей активностью. Методом автоматического секвенирования была установлена его полная АП (рис. 3 Б), которая, подобно хелиантамиду, содержит структурный мотив 7YIYN10, ответственный за ингибирование α -амилаз. Магнификамид является, таким образом, вторым представителем ингибиторов α -амилаз семейства β -дефензинов, выделенных из актиний.

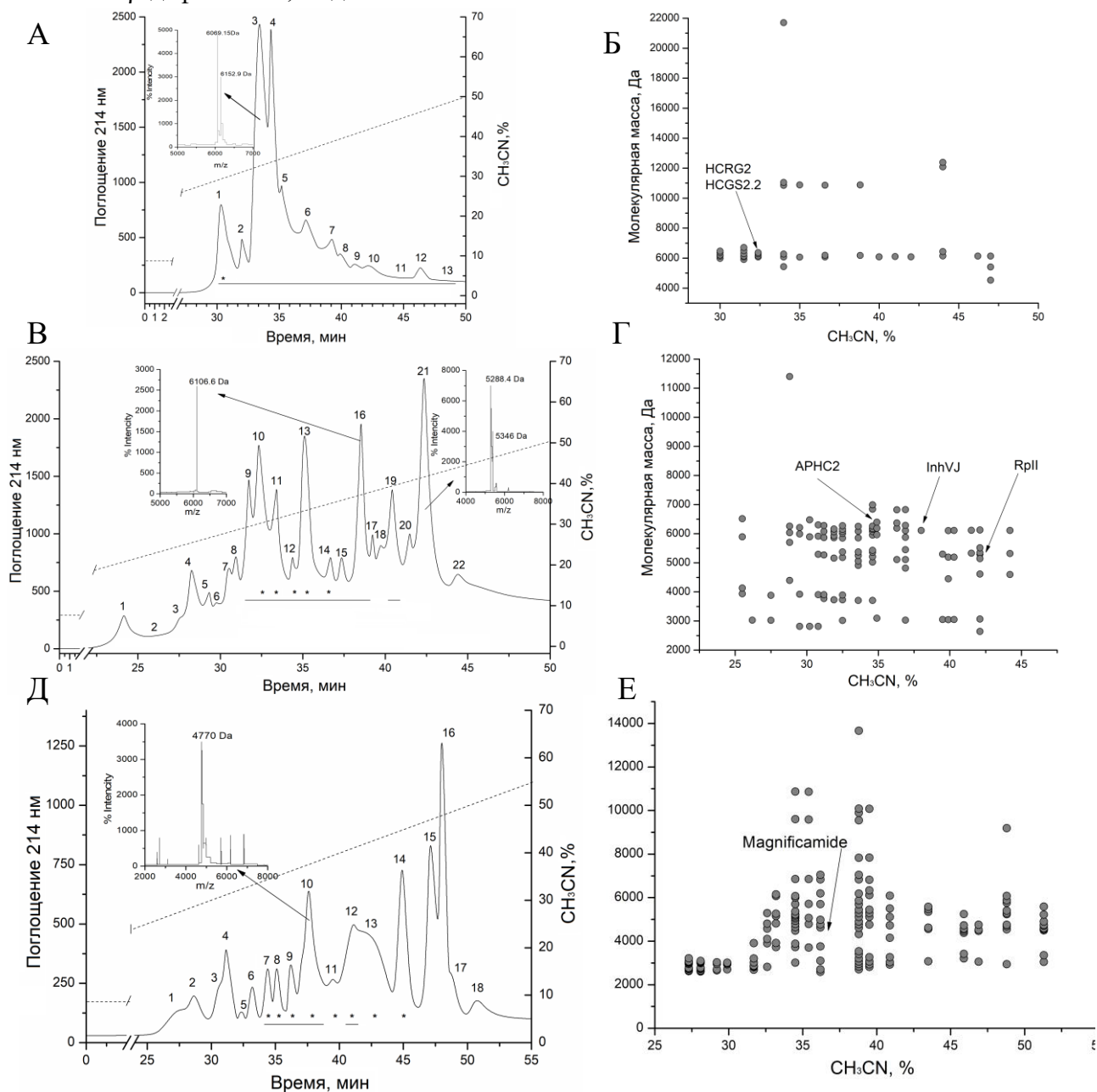


Рисунок 2 – ОФ ВЭЖХ пептидов фракций 2 (А), 3 (В) и 4 (Д), полученных в результате гелевой фильтрации (рис. 1 Б). Распределение пептидов фракций 2 (Б), 3 (Г) и 4 (Е) по молекулярным массам и гидрофобности. Трипсинингибирующая активность – сплошная линия, ингибирование РРА – (*).

В результате проведенного исследования было установлено, что в ядовитом секрете актинии *H. magnifica* присутствует большое количество пептидов с молекулярной массой около 6000 Да, обладающих трипсинингибирующей активностью. В связи с этим можно предположить наличие у *H. magnifica* комбинаторной библиотеки пептидов Кунитц-типа, насчитывающей более 60 представителей, которая подобна библиотеке пептидов Кунитц-типа, кодируемых мультигенным семейством актинии *H. crispa* (Isaeva et al., 2012). В ходе анализа идентифицировано несколько пептидов, идентичных таковым актинии *H. crispa*.

Так, во фракции 3а находилось два пептида, молекулярная масса которых соответствовала выделенному в этой работе пептиду HCRG2 (6151 Да) (выделение и установление АП описаны ниже) и HCGS2.2 (6068 Да) (рис. 2 А, Б), выведенному ранее на основании НП (Isaeva et al., 2012). Во фракции 13б находился пептид с молекулярной массой, идентичной пептиду APHC2 (6185 Да) (Козлов и др., 2009), а во фракции 16б – идентичной InhVJ (6106 Да) (Gladkikh et al., 2012) (рис. 2 В, Г). АП N-концевых фрагментов пептидов были определены автоматической деградацией по методу Эдмана. Полные АП были установлены на основании сравнения результатов секвенирования фрагментов, полученных в результате гидролиза восстановленных пептидов эндопротеиназой Glu-C V8 из *Staphylococcus aureus*, с последовательностями известными пептидов Кунитц-типа. Таким образом, было подтверждено, что некоторые пептиды Кунитц-типа, экспрессирующиеся в ядовитом секрете *H. magnifica*, идентичны таковым актинии *H. crispa* (рис. 3 А).

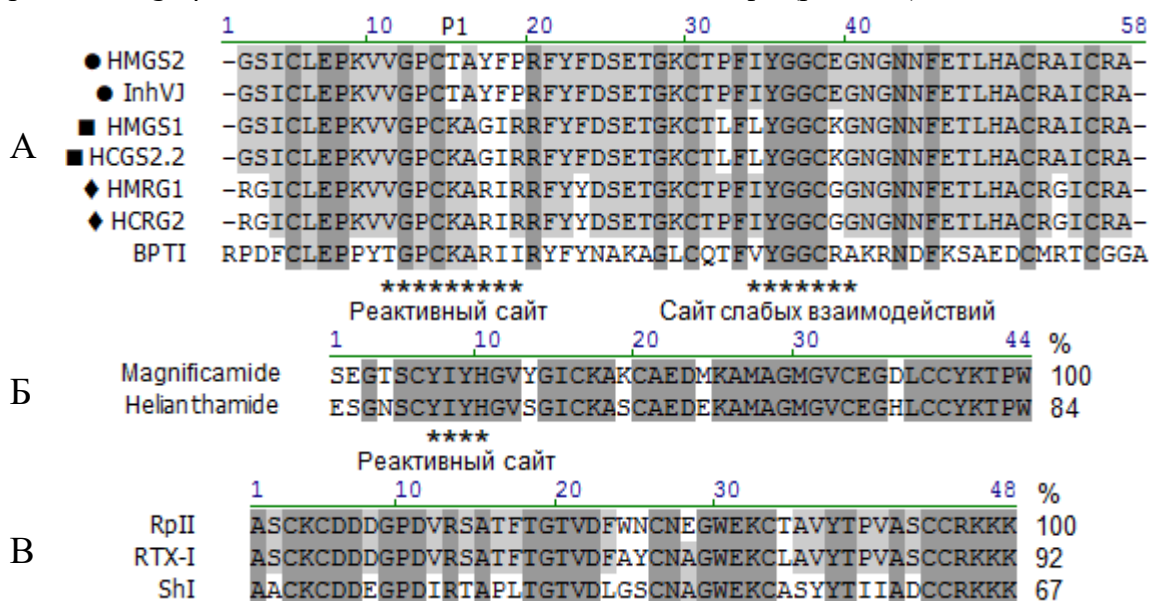


Рисунок 3 – Выравнивание АП (А) HMRG1, HMGS1, HMGS2, пептидов Кунитц-типа из *H. magnifica*, HCRG1, HCRG2, HCGS2.2, InhVJ (P0DMJ5), пептидов из *H. crispa*, BPTI (P00974) из *Bos taurus*; (Б) ингибиторов α-амилаз, magnificamide из *H. magnifica* и helianthamide (A0A0X1KGZ5) из *Stichodactyla helianthus*; (В) токсинов RpII (P01534) из *H. magnifica*, RTX-I (P30831) из *H. crispa*, ShI (P19651) из *S. helianthus*. Идентичные а.о. показаны на темно-сером фоне, консервативные – на светло-сером. Идентичные АП отмечены символами (●HMGS2=InhVJ, ■HMGS1=HCGS2.2, ◆HMRG1=HCRG2).

В результате протеомного анализа установлено, что ингибиторы протеиназ Кунитц-типа являются, наряду с нейро- и α-пороформирующими токсинами, главными компонентами ядовитого секрета актинии *H. magnifica*. Впервые экспериментально подтверждено, что эти пептиды синтезируются в виде комбинаторной библиотеки, насчитывающей более 60 представителей. Установлено, что основными (мажорными) изоформами пептидов Кунитц-типа *H. magnifica* являются HMGS2 и HMRG1, которые идентичны пептидам InhVJ и HCRG2 выделенным из актинии *H. crispa*.

Установление последовательностей транскриптов, кодирующих пептиды Кунитц-типа актинии *H. magnifica*

Для установления разнообразия транскриптов, кодирующих пептиды Кунитц-типа актинии *H. magnifica*, был применен метод 3'-RACE. Ген-специфичные праймеры были разработаны на основе последовательностей нативных пептидов Кунитц-типа актиний *H. magnifica* и *H. crispa*. В результате ПЦР, клонирования и секвенирования были получены НП

пяти изоформ Кунитц-типа (рис. 4). Последовательности Hm3_1 и Hm3_3 были превалирующими, они составляли 37,5 и 25% обнаруженных транскриптов соответственно. Установлено, что вариабельные остатки находятся как в реактивном сайте (Lys или Thr в позиции X₁, Arg или Tyr в X₂, Ile или Phe в X₃), так и в сайте слабых взаимодействий (Gly или Glu в позиции X₇) выведенных АП пептидов Кунитц-типа. Большинство замен аминокислотных остатков находится в тех же позициях, что и в пептидах *H. crispa*, за исключением позиций X₄–X₆ и X₈–X₁₀.

GSP1	1	AACCACAACAGAGAGCAAAGACAAGATAACAAGATGAAGGGAACCTTTCTTATTTGTCTGATCCTAATTGCAGGTTTCTCT	81
GSP2	1	AACCACAACAGAGAGCAAAGACAAGATAACAAGATGAAGGGAACCTTTCTTATTTGTCTGATCCTAATTGCAGGTTTCTCT	81
GSP3	1	AACCACAACAGAGAGCAAAGACAAGATAACAAGATGAAGGGAACCTTTCTTATTTGTCTGATCCTAATTGCAGGTTTCTCT	81
		M K G T F L I C L I L I A G F S	
Hm3_1	1	CCTAAGGTTGTAGGACCGTGAATGCACGTATTCGAAGATTCTAC	45
Hm3_2	1	CCTAAGGTTGTAGGACCGTGAATGCACGTATTCGAAGATTCTAC	45
Hm3_3	1	CCTAAGGTTGTAGGACCGTGAATGCACGTATTCGAAGATTCTAC	45
Hm3_8	1	CCTAAGGTTGTAGGACCGTGAATGCACGTATTCGAAGATTCTAC	45
Hm3_10	1	CCTAAGGTTGTAGGACCGTGAATGCACGTATTCGAAGATTCTAC	45
GSP1	82	TTCAAAGCACTCAAGCCGGTAGCATTTGTTTAGAACCCAAAGTAGTTGGCCCGTGTAAAGCAGTATTCGAAGATTCTAC	162
GSP2	82	TTCAAAGCACTCAAGCCGGTAGCATTTGTTTAGAACCCAAAGTAGTTGGCCCGTGTAAAGCAGTATTCGAAGATTCTAC	162
GSP3	82	TTCAAAGCACTCAAGCCGGTAGCATTTGTTTAGAACCCAAAGTAGTTGGCCCGTGTAAAGCAGTATTCGAAGATTCTAC	162
		F K S T Q A G S I C L E P K V V G P C X ₁ A X ₂ X ₃ X ₄ ' R F Y	
Hm3_1	46	TACGATTCAGAGACTGGAAGTGCACACCGTTTCATCTACGGTGGATGCGGGGAAATGGGAATAACTTTGAGACCCCTGCAT	126
Hm3_2	46	TACGATTCAGAGACTGGAAGTGCACACCGTTTCATCTACGGTGGATGCGGGGAAATGGGAATAACTTTGAGACCCCTGCAT	126
Hm3_3	46	TACGATTCAGAGACTGGAAGTGCACACCGTTTCATCTACGGTGGATGCGGGGAAATGGGAATAACTTTGAGACCCCTGCAT	126
Hm3_8	46	TACGATTCAGAGACTGGAAGTGCACACCGTTTCATCTACGGTGGATGCGGGGAAATGGGAATAACTTTGAGACCCCTGCAT	126
Hm3_10	46	TACGATTCAGAGACTGGAAGTGCACACCGTTTCATCTACGGTGGATGCGGGGAAATGGGAATAACTTTGAGACCCCTGCAT	126
GSP1	163	TTTCGATTCAGAGACTGGAAGTGCACACCGTTTCATCTACGGTGGATGCGGGGAAATGGGAATAACTTTGAGACCCCTGCAT	243
GSP2	163	TTTCGATTCAGAGACTGGAAGTGCACACCGTTTCATCTACGGTGGATGCGGGGAAATGGGAATAACTTTGAGACCCCTGCAT	243
GSP3	163	TTTCGATTCAGAGACTGGAAGTGCACACCGTTTCATCTACGGTGGATGCGGGGAAATGGGAATAACTTTGAGACCCCTGCAT	243
		F D S E T G K C T X ₅ ' F X ₆ ' Y G G C X ₇ G N G N N F E T L H	
		A C R X ₉ I C X ₁₀ A stop	
Hm3_1	127	GCATGCCGAGCTATATGCAGGGCGTAATCTTGTGTTAGAAGAGCAATGAGAAGTTAGAAATTGCTACAAAACTCAAAATAAAG	207
Hm3_2	127	GCATGCCGAGCTATATGCAGGGCGTAATCTTGTGTTAGAAGAGCAATGAGAAGTTAGAAATTGCTACAAAACTCAAAATAAAG	207
Hm3_3	127	GCATGCCGAGCTATATGCAGGGCGTAATCTTGTGTTAGAAGAGCAATGAGAAGTTAGAAATTGCTACAAAACTCAAAATAAAG	207
Hm3_8	127	GCATGCCGAGCTATATGCAGGGCGTAATCTTGTGTTAGAAGAGCAATGAGAAGTTAGAAATTGCTACAAAACTCAAAATAAAG	207
Hm3_10	127	GCATGCCGAGCTATATGCAGGGCGTAATCTTGTGTTAGAAGAGCAATGAGAAGTTAGAAATTGCTACAAAACTCAAAATAAAG	207
GSP1	244	GCATGCCGAGCTATATGCAGGGCGTAATCTTGTGTTAGAAGAGCAATGAGAAGTTAGAAATTGCTACAAAACTCAAAATAAAG	324
GSP2	244	GCATGCCGAGCTATATGCAGGGCGTAATCTTGTGTTAGAAGAGCAATGAGAAGTTAGAAATTGCTACAAAACTCAAAATAAAG	324
GSP3	244	GCATGCCGAGCTATATGCAGGGCGTAATCTTGTGTTAGAAGAGCAATGAGAAGTTAGAAATTGCTACAAAACTCAAAATAAAG	324
		A C R A I C R A stop	
Hm3_1	208	ATAAAAAATAAAGATGTAATTCATTAACGTGGATTAAATAATTGTATTAAGTGAAGTGGGAATAAAGGATGCCAATCC	288
Hm3_2	208	ATAAAAAATAAAGATGTAATTCATTAACGTGGATTAAATAATTGTATTAAGTGAAGTGGGAATAAAGGATGCCAATCC	288
Hm3_3	208	ATAAAAAATAAAGATGTAATTCATTAACGTGGATTAAATAATTGTATTAAGTGAAGTGGGAATAAAGGATGCCAATCC	288
Hm3_8	208	ATAAAAAATAAAGATGTAATTCATTAACGTGGATTAAATAATTGTATTAAGTGAAGTGGGAATAAAGGATGCCAATCC	288
Hm3_10	208	ATAAAAAATAAAGATGTAATTCATTAACGTGGATTAAATAATTGTATTAAGTGAAGTGGGAATAAAGGATGCCAATCC	288
GSP1	325	ATAAAAAATAAAGATGTAATTCATTAACGTGGATTAAATAATTGTATTAAGTGAAGTGGGAATAAAGGATGCCAATCC	405
GSP2	325	ATAAAAAATAAAGATGTAATTCATTAACGTGGATTAAATAATTGTATTAAGTGAAGTGGGAATAAAGGATGCCAATCC	405
GSP3	325	ATAAAAAATAAAGATGTAATTCATTAACGTGGATTAAATAATTGTATTAAGTGAAGTGGGAATAAAGGATGCCAATCC	405
Hm3_1	289	ACAAAAAATAAAGATGTAATTCATTAACGTGGATTAAATAATTGTATTAAGTGAAGTGGGAATAAAGGATGCCAATCC	319
Hm3_2	289	ACAAAAAATAAAGATGTAATTCATTAACGTGGATTAAATAATTGTATTAAGTGAAGTGGGAATAAAGGATGCCAATCC	314
Hm3_3	289	ACAAAAAATAAAGATGTAATTCATTAACGTGGATTAAATAATTGTATTAAGTGAAGTGGGAATAAAGGATGCCAATCC	319
Hm3_8	289	ACAAAAAATAAAGATGTAATTCATTAACGTGGATTAAATAATTGTATTAAGTGAAGTGGGAATAAAGGATGCCAATCC	320
Hm3_10	289	ACAAAAAATAAAGATGTAATTCATTAACGTGGATTAAATAATTGTATTAAGTGAAGTGGGAATAAAGGATGCCAATCC	319
GSP1	406	ACAAAAAATAAAGATGTAATTCATTAACGTGGATTAAATAATTGTATTAAGTGAAGTGGGAATAAAGGATGCCAATCC	435
GSP2	406	ACAAAAAATAAAGATGTAATTCATTAACGTGGATTAAATAATTGTATTAAGTGAAGTGGGAATAAAGGATGCCAATCC	435
GSP3	406	ACAAAAAATAAAGATGTAATTCATTAACGTGGATTAAATAATTGTATTAAGTGAAGTGGGAATAAAGGATGCCAATCC	427

Рисунок 4 – Выравнивание нуклеотидных последовательностей 3'-RACE кДНК (Hm3_1–Hm3_3, Hm3_8, Hm3_10) и полноразмерных кДНК (GSP1–GSP3), кодирующих пептиды *H. magnifica* и *H. crispa* соответственно. Сигнальный пептид и вариабельные нуклеотиды показаны на голубом фоне. Стоп кодон, сайт полиаденилирования и поли(А)-тракт выделены красным. Вариабельные а.о. обозначены буквой X в консенсусной АП над НП *H. magnifica* и под НП *H. crispa*. Остаток X₁ представлен Thr или Lys; X₂ – Arg, Tyr или Gly; X₃ – Ile или Phe; X₄ – Tyr или Phe; X₄' – Arg или Pro; X₅ – Asp или Glu; X₅' – Pro или Leu; X₆ – Ser или Thr; X₆' – Ile или Leu; X₇ – Gly, Glu или Lys; X₈ – His или Arg; X₉ – Gly или Ala, X₁₀ – Arg или Trp. Реактивный сайт показан рамкой красного цвета, сайт слабых взаимодействий – голубого.

Для получения НП транскриптов, кодирующих зрелые пептиды *H. magnifica*, были разработаны ген-специфичные праймеры, направленные на N- и C-концевые фрагменты пептидов. В результате ПЦР, клонирования и секвенирования было получено четыре уникальных последовательности (HMGS3c1, HMGS3c4, HMGS3c6 и HMGS3c9). Нуклеотидные последовательности данных транскриптов оказались высокоидентичны (до 100%) последовательностям мультигенного HCGS субсемейства пептидов Кунитц-типа актинии *H. crispa*, описанного ранее (Isaeva et al., 2012). Было установлено, что большинство транскриптов (70%) кодирует пептид HMGS3c1(=APHC2), расчетная молекулярная масса которого оказалась идентичной массе пептида, обнаруженного, согласно МС данным, во фракции 136. Последовательности HMGS3c1 и HMGS3c9 были идентичны последовательностям пептидов APHC2 и HCGS2.27, соответственно, из *H. crispa*, в то время как последовательности HMGS3c4 и HMGS3c6 были обнаружены только в *H. magnifica*.

Анализ транскриптов, кодирующих пептиды Кунитц-типа *H. magnifica*, показал, что большинство замен аминокислотных остатков локализовано в тех же позициях, что в последовательностях пептидов *H. crispa*. Среди транскриптов присутствуют как общие для *H. magnifica* и *H. crispa*, так и уникальные для каждого вида представители.

Выделение новых пептидов Кунитц-типа из актинии *H. crispa*

Ранее нами было установлено, что осадок, полученный в результате ацетонового осаждения пептидов водного экстракта *H. crispa*, проявляет трипсинингибирующую активность, что указывало на содержащиеся в нем ингибиторы протеиназ Кунитц-типа. Для их выделения использовали схему, включающую гель-фильтрацию на акрилексе Р-4 и катионообменную хроматографию на целлюлозе КМ-32. В данной работе было проведено разделение пептидов с помощью ОФ ВЭЖХ на колонке Nucleosil C₁₈. В результате было получено два новых пептида, названных HCRG1 (6196 Да) и HCRG2 (6149 Да) (рис. 5), которые ингибировали трипсин.

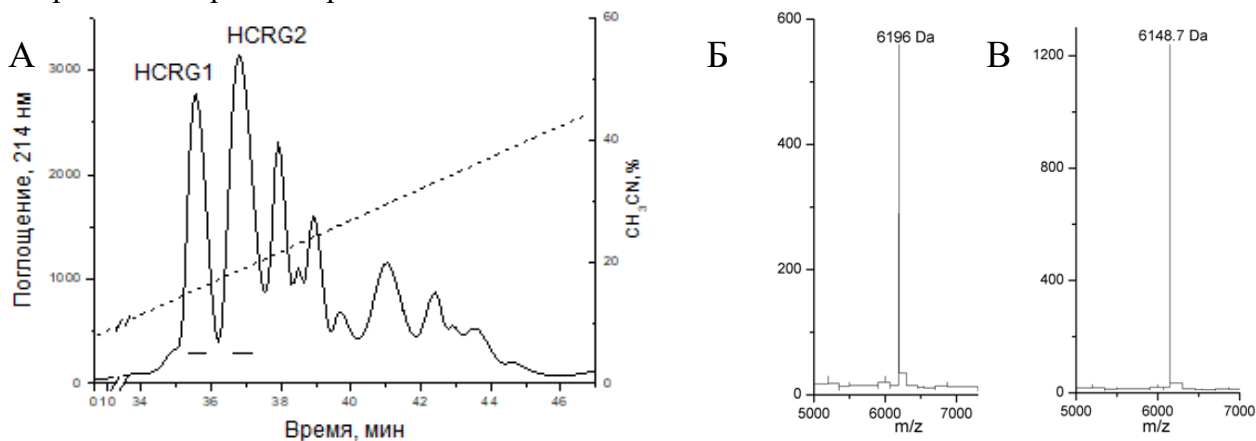


Рисунок 5 – (А) Профиль элюции пептидов ОФ ВЭЖХ на колонке Nucleosil C₁₈ в линейном градиенте концентрации CH₃CN (10–70%). Сплошной линией показаны границы объединения фракций, ингибирующих трипсин. Масс-спектры пептидов HCRG1 (Б) и HCRG2 (В).

N-концевые АП пептидов HCRG1 и HCRG2 (43 и 29 а.о.) были определены автоматической деградацией по методу Эдмана. Для установления полной АП был проведен гидролиз восстановленных пептидов эндопротеиназой Glu-C V8 из *S. aureus*. АП были установлены на основании сравнения результатов секвенирования фрагментов последовательностей с известными последовательностями пептидов Кунитц-типа (рис. 6). Аминокислотные последовательности HCRG1 и HCRG2 оказались на 75–77% идентичны

последовательностям APHC1–APHC3 и InhVJ пептидов Кунитц-типа, выделенных ранее из *H. crisper*. В отличие от APHC1–APHC3 и InhVJ последовательности HCRG1 и HCRG2 содержат, подобно БПТИ, а.о. Lys в положении P1 реактивного сайта. Данные пептиды, наряду с InhVJ(=HMG2), являются основными компонентами ядовитого секрета *H. crisper*.

	1	10	P1	20	30	40	58 %			
HCRG1	-RGICSEPKVVGPC	KAGLRFRFYD	SETGEC	LPFIYGGCKGNK	NNFETLHACRGICRA	-	100			
HCRG2	-RGICSEPKVVGPC	KARIRFRFYD	SETGKCTP	FIIYGGCGGNG	NNFETLHACRGICRA	-	88			
APHC1	-GSICSEPKVVGPC	TAYFRFRFYD	SETGKCTV	FIIYGGCEGNG	NNFETLRACRAICRA	-	75			
APHC2	-GSICSEPKVVGPC	TAYFRFRFYD	SETGKCTP	FIIYGGCEGNG	NNFETLRACRAICRA	-	77			
APHC3	-GSICSEPKVVGPC	TAYFRFRFYD	SETGKCTP	FIIYGGCEGNG	NNFETLRACRGICRA	-	75			
InhVJ	-GSICSEPKVVGPC	TAYFRFRFYD	SETGKCTP	FIIYGGCEGNG	NNFETLRACRAICRA	-	77			
BPTI	RPDFCLEPPYTGPCK	ARIIRYFYNAKAS	LCQTEVYGGC	RAKRNNFKSAED	CMRTCGGA		39			

	Реактивный сайт									

	Сайт слабых взаимодействий									

Рисунок 6 – Выравнивание АП ингибиторов протеиназ Кунитц-типа: HCRG1, HCRG2, InhVJ (P0DMJ5), APHC1–APHC3 (B2G331, C0HJF4, C0HJF3) из *H. crisper*, BPTI (P00974) из *B. taurus*. Идентичные а.о. показаны на темно-сером фоне, консервативные – на светло-сером.

Филогенетический анализ пептидов Кунитц-типа актиний *H. crisper* и *H. magnifica*

В данной работе было установлено, что ингибиторы протеиназ Кунитц-типа являются основными компонентами ядовитого секрета *H. magnifica*, а некоторые представители оказались идентичными пептидам Кунитц-типа *H. crisper*. В связи с этим нами был проведен филогенетический анализ, согласно которому пептиды Кунитц-типа актиний семейства Stichodactylidae могут быть сгруппированы в четыре кластера (рис. 7). Кластер I состоит из пептидов, АП которых в положении P1 содержат, как и БПТИ, остаток Lys. К ним относятся нативные пептиды HCRG1 и HCRG2(=HMRG1), а в результате анализа транскриптов показана наибольшая экспрессия гена, кодирующего пептид HCGS1.20 (18,5%) *H. crisper* (Isaeva et al., 2012). Биологическая активность представителей данного кластера еще не изучена. Кластер II состоит из пептидов, АП которых содержат в P1 положении остаток Thr (рис. 7, 8). Пептиды APHC1 и APHC3, входящие в состав этого кластера, кроме ингибирования трипсина модулируют рецептор TRPV1 и обладают анальгетическим действием *in vivo* (Andreev et al., 2008). Наибольшим процентом идентичности АП обладают HCGS1.10, HCGS1.36, HCRG21, также входящие в состав этого кластера. Кластер III включает пептиды, АП которых содержат остаток Arg в положении P1 (рис. 7, 8) и пептиды ShPI-1 и ShPI-2 из актинии *S. helianthus*, содержащие остаток Lys в этом положении. Полифункциональный пептид ShPI-1 ингибирует активность протеиназ различных классов (сериновые, цистеиновые, аспарагиновые) и блокирует потенциал-зависимые калиевые каналы ($K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v1.6$) (García-Fernández et al., 2016). Наибольшим процентом идентичности АП относительно таковой ShPI-1 обладает последовательность пептида HCGS1.19 из *H. crisper*. Блокатор K_v , токсин Кунитц-типа SHTXIII (Honma et al., 2008), а также подобные ему пептиды *H. crisper* и *Stichodactyla mertensii* формируют кластер IV. Ранее было показано, что наиболее представленными являются транскрипты, кодирующие пептиды HCTX1 и SMTX1 (Чаусова, 2012).

Среди пептидов Кунитц-типа *H. crisper* и *H. magnifica* в филогенетическом древе можно выделить пять ветвей, образованных идентичными пептидами (HMRG1=HCRG2, HMGS1=HCGS2.2, HMGS2=InhVJ, HMGS3c1=APHC2, HMGS3c9=HCGS2.27), которые кодируются ортологичными генами. В яде обеих актиний наблюдается высокое содержание двух основных изоформ, содержащих в положении P1 остатки Lys (HMRG1=HCRG2) и Thr (HMGS2=InhVJ), что указывает на их возникновение до разделения актиний рода *Heteractis*

на отдельные виды. Пептиды, формирующие дивергентные ветви, могут являться результатом дупликации ортологичных и диверсификации паралогичных генов, как предполагалось ранее для змей, скорпионов и актиний. Аналогичная картина наблюдается для пептидов Кунитц-типа актиний семейства Actiniidae, *Anemonia viridis* и *A. sulcata*, в яде которых найдены как идентичные изоформы (AsKC1=AsKC1a, SA5II=SA5III) (Kozlov and Grishin, 2011), так и уникальные для каждого вида (рис. 7).

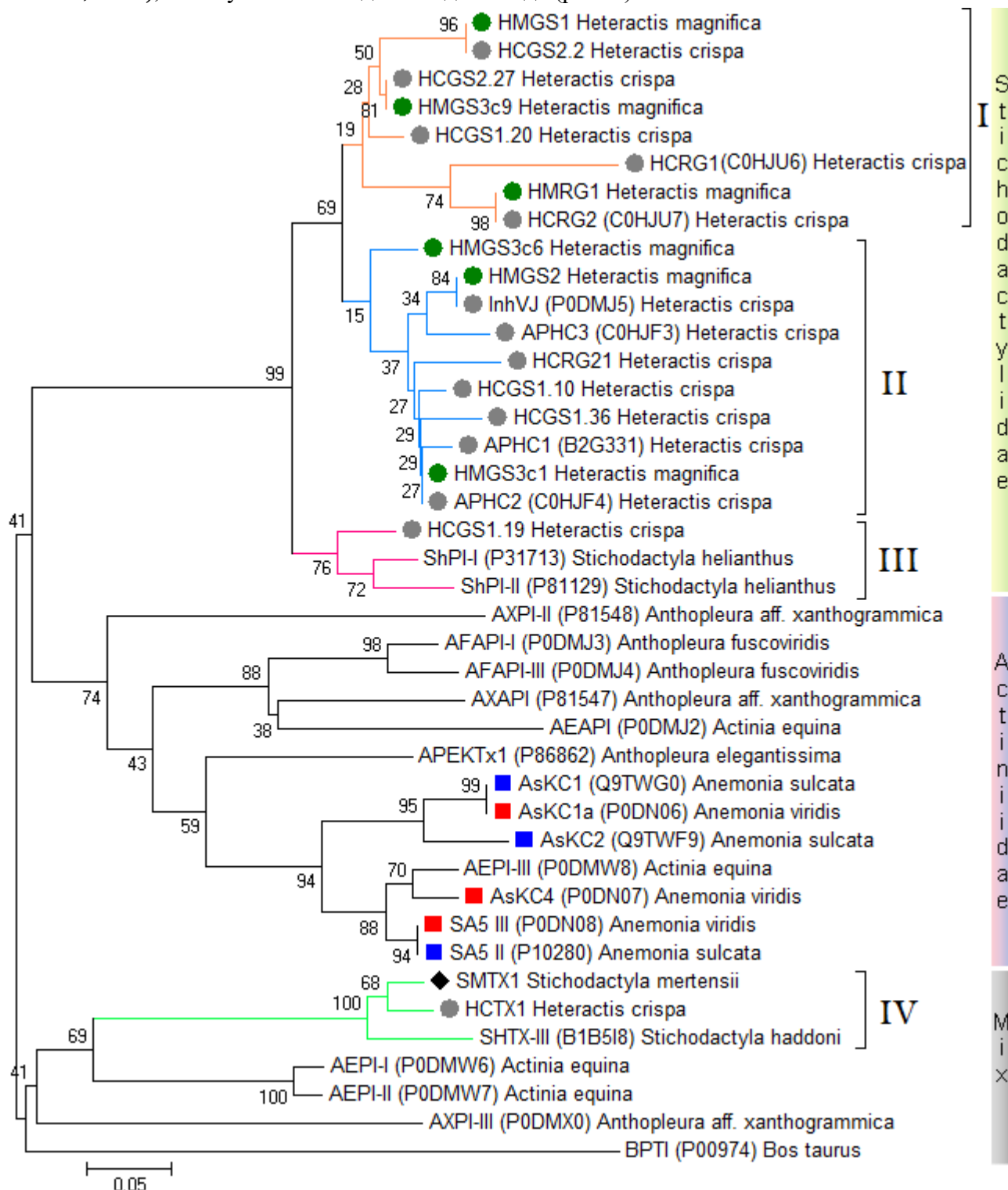


Рисунок 7 – Филогенетическое дерево пептидов Кунитц-типа актиний и БПТИ, построенное методом ближайшего соседа (NJ) в MEGA 7. Пептиды из *H. magnifica* отмечены зелеными кругами, *H. crisa* – серыми кругами, из *A. sulcata* – синими квадратами, из *A. viridis* – красными квадратами, из *S. mertensii* – черным ромбом.

		1	10	p1 20	30	40	50	62	%
I	HCGS 1.20	----	GSICLEPKVVGPC	KARIRRFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNNFETLHACRAICRA	----	----	----	----	100
	HCRG1	----	RGICSEPKVVGPC	KAGLRRFYFDSETGECLPFIYGGCKGNKNNFETLHACRGICRA	----	----	----	----	80
	HCRG2	----	RGICLEPKVVGPC	KARIRRFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNNFETLHACRGICRA	----	----	----	----	93
	APHC1	----	GSICLEPKVVGPC	TAYFRRFYFDSETGKCTVFIYGGCEGNGNNFETLRACRAICRA	----	----	----	----	89
	APHC2	----	GSICLEPKVVGPC	TAYFRRFYFDSETGKCTPFIYGGCEGNGNNFETLRACRAICRA	----	----	----	----	91
II	APHC3	----	GSICLEPKVVGPC	TAYFRFYFNSETGKCTPFIYGGCEGNGNNFETLRACRGICRA	----	----	----	----	86
	InhVJ	----	GSICLEPKVVGPC	TAYFRFYFDSETGKCTPFIYGGCEGNGNNFETLHACRAICRA	----	----	----	----	91
	HCGS 1.10	----	GSICLEPKVVGPC	TAYLRRFYFDSETGKCTPFIYGGCEGNGNNFETLRACRAICRA	----	----	----	----	91
	HCGS 1.36	----	GSICLEPKVVGPC	TAYFRRFYFDSETGKCTPFIHGGCEGNGNNFETLRACRAICRA	----	----	----	----	88
	HCRG21	----	RGICSEPKVVGPC	TAYFRRFYFDSETGKCTPFIYGGCEGNGNNFETLRACRAICRA	----	----	----	----	86
III	HCGS 1.19	----	GSICLEPKVVGRC	SGSFPRFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNNFETLHACRAICRA	----	----	----	----	88
	ShPI-1	----	SICSEPKVVGRC	KGYFPRFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNNFETLHQCRAICRA	----	----	----	----	85
IV	HCTX1	TEEMPALCRLQPV	AGKCRGYFPRYYNPEV	GKCEQFIYGGCGGNGNNFESFEACRATCIIP	50				
	SMTX1	TEEMPALCRLQPV	AGKCRGYFPRYYNPEV	GKCEQFIYGGCGGNGNNFASFEACRATCIIP	50				
	SMTX1 A49E	TEEMPALCRLQPV	AGKCRGYFPRYYNPEV	GKCEQFIYGGCGGNGNNFESFEACRATCIIP	52				
	SHTXIII	TEEMPALCHLQPD	VPKCRGYFPRYYNPEV	GKCEQFIYGGCGGNGNNFVSFEACRATCIIP	46				
	BPTI	----	RPDFCLEPPYTGP	CKARIIRFYNAKAGLCQTEVYGGCRAKRNNFKSAEDCMRTCGGA	43				
			*****		*****				
			Реактивный сайт		Сайт слабых взаимодействий				

Рисунок 8 – Выравнивание АП пептидов Кунитц-типа APHC1 (B2G331), APHC2 (C0HJF4), APHC3 (C0HJF3), InhVJ (P0DMJ5), HCRG1, HCRG2, HCRG21, HCGS1.10, HCGS1.19, HCGS1.20, HCGS1.36, HCTX1 актинии *H. crisa*, SMTX1 и rSMTX1_A49E из *S. mertensii*, SHTXIII (B1B5I8) из *S. haddoni*, ShPI-1 (P31713) из *S. helianthus* и BPTI (P00974) из *B. taurus*. Идентичные а.о. показаны на темно-сером фоне, консервативные – на светло-сером.

Большое разнообразие пептидов Кунитц-типа, присутствующих в ядовитом секрете актиний, обеспечивает выполнение функций, необходимых для успешного существования актиний на протяжении сотен миллионов лет. Они могут контролировать активность эндогенных протеиназ и осуществлять защиту от протеиназ хищников и жертв. Помимо этого, некоторые пептиды Кунитц-типа оказывают нейротоксическое действие на организм жертвы благодаря способности модулировать активность ионных каналов и рецепторов. Для расширения знаний о функциях пептидов отдельных кластеров комбинаторной библиотеки актинии *H. crisa* и выявления пептидов Кунитц-типа, модулирующих ионные каналы и рецепторы, были отобраны следующие представители: HCGS1.10, HCGS1.19, HCGS1.20, HCGS1.36, HCRG21 и HCTX1 из *H. crisa*, а также SMTX1 из *S. mertensii*, с целью получения их рекомбинантных аналогов.

Получение рекомбинантных пептидов Кунитц-типа

Для создания экспрессионных конструкций был использован плазмидный вектор pET-32b(+), который позволяет получать рекомбинантные пептиды в составе гибридного белка, состоящего из целевого пептида, белка партнера, тиоредоксина, обеспечивающего корректное замыкание дисульфидных связей, а также полигистидиновой последовательности (6×His), необходимой для проведения металл-аффинной хроматографии. Для отделения целевого пептида от гибридного белка перед его последовательностью был введен остаток Met. Из набора праймеров в результате двух этапов ПЦР были собраны искусственные гены, кодирующие пептиды HCTX1, SMTX1, а также мутантный пептид SMTX1_A49E. Для получения экспрессионной конструкции фрагмент, кодирующий целевой пептид, клонировали по сайтам рестрикции, *EcoRI* и *XhoI*, в вектор pET-32b(+).

Гетерологичную экспрессию проводили в клетках штамма *Escherichia coli* BL21(DE3). Гибридные белки выделяли из клеточного лизата с помощью аффинной хроматографии, затем их обрабатывали бромистым цианогеном, и целевые пептиды очищали методом ОФ

ВЭЖХ. Согласно данным МС анализа, молекулярная масса пептидов rHCTX1, rSMTX1 и rSMTX1_A49E составила 6980 Да, 6922 Да и 6980 Да соответственно, что подтверждает расчетные данные. Средний выход пептидов составил от 8 до 20 мг на литр клеточной культуры ($A_{600} = 0,6-0,8$).

Рекомбинантные пептиды HCGS1.10, HCGS1.19, HCGS1.20, HCGS1.36, HCRG21 были получены с помощью готовых экспрессионных конструкций на основе вектора pET-32b(+) по методике, описанной выше. Чистоту рекомбинантных пептидов проверяли МС анализом. Молекулярные массы пептидов соответствовали расчетным: 6151 Да для rHCGS1.10, 6089 Да для rHCGS1.19, 6079 Да для rHCGS1.20, 6175 Да для rHCGS1.36, 6229 Да для rHCRG21. Средний выход целевых пептидов составил от 4 до 20 мг на литр клеточной культуры ($A_{600} = 0,6-0,8$).

В бактериальной системе синтезировано и затем выделено и очищено восемь рекомбинантных пептидов, представителей дивергентных групп пептидов Кунитц-типа актиний семейства Stichodactylidae, в количествах, достаточных для исследования их активности.

Исследование биологической активности нативных и рекомбинантных пептидов

Определение трипсинингибирующей активности пептидов

Все полученные в данной работе нативные и рекомбинантные пептиды Кунитц-типа ингибировали трипсин. Константы ингибирования трипсина (K_i), определенные по методу Диксона, варьировали в диапазоне концентраций от 20 до 200 нМ, несмотря на наличие существенных замен в реактивном сайте, включая замену функционально-значимого остатка в положении P1 (табл. 1; результаты, полученные в данной работе, показаны на сером фоне).

Таблица 1 – Константы ингибирования трипсина пептидов Кунитц-типа

Источник	Пептид	Реактивный сайт	K_i , М
<i>Heteractis crispa</i>	InhVJ(=HMGS2)	VGPCTAYFP	$7,4 \times 10^{-8}$
	APHC1	VGPCTAYFR	1×10^{-6}
	APHC2	VGPCTAYFR	9×10^{-7}
	APHC3	VGPCTAYFP	5×10^{-7}
	HCRG1	VGPKKAGLR	$2,8 \times 10^{-8}$
	HCRG2(=HMRG1)	VGPKKARIR	5×10^{-8}
	rHCRG21	VGPCTAYFR	2×10^{-7}
	rHCGS1.10	VGPCTAYLR	$2,1 \times 10^{-7}$
	rHCGS1.36	VGPCTAYFR	1×10^{-7}
	rHCGS1.19	VGRCRGSFP	3×10^{-8}
	rHCGS1.20	VGPKKARIR	$2,1 \times 10^{-8}$
	rHCTX1	VGKCRGYFP	$5,7 \times 10^{-8}$
<i>Stichodactyla mertensii</i>	rSMTX1	VGKCRGYFP	$4,6 \times 10^{-8}$
	rSMTX1_A49E	VGKCRGYFP	$5,4 \times 10^{-8}$
<i>Stichodactyla helianthus</i>	ShPI-1	VGRCKGYFP	$1,1 \times 10^{-10}$
<i>Anthopleura elegantissima</i>	APEKTx1	QGFCRARFP	$1,2 \times 10^{-7}$
<i>Anemonia sulcata</i>	AsKC1	VGRCRASHP	$<3 \times 10^{-10}$
	AsKC2	VGRCRARHP	
	AsKC3	VGRCRARFP	
<i>Ornithoconus huwena</i>	HWTX-XI	RGRCKASFE	$2,8 \times 10^{-10}$
<i>Lychas mucronatus</i>	LmKTT-1a	VGKGKASFT	$1,4 \times 10^{-7}$
<i>Hadrurus gertschi</i>	Hg1	TGPKKGSFA	1×10^{-7}
<i>Bos taurus</i>	BPTI	TGPKKARII	6×10^{-14}

Согласно литературным данным, замена а.о. Lys/Arg на Thr в положении P1 в молекуле БПТИ приводит к увеличению K_i трипсина на 8 порядков, а именно с 10^{-14} до 10^{-6} М. Значения K_i трипсина исследуемых пептидов с Lys или Arg в положении P1 аминокислотной последовательности оказались лишь приблизительно на один порядок меньше, чем у пептидов с Thr, за исключением InhVJ. По сравнению с пептидами Кунитц-типа, блокаторами K_v , выделенными из актиний, пауков и скорпионов (ShPI-1, АРЕКТх1, AsKC1–AsKC3, HWTX-XI, LmKTT-1a, Hg1), константы ингибирования трипсина исследуемых пептидов отличаются на 1–2 порядка, как в меньшую, так и в большую сторону (табл. 1). Хотя в реактивном центре АП токсинов Hg1, LmKTT, АРЕКТх1 также находятся остатки Lys или Arg, эти пептиды не являются мощными ингибиторами трипсина. Данный факт указывает на то, что мишенью действия исследуемых пептидов могут являться другие протеиназы, либо эти пептиды приобрели функции токсинов и взаимодействуют с ионными каналами и рецепторами.

Анализ острой токсичности пептидов

Исследование острой токсичности пептидов rInhVJ, rHCGS1.10, rHCGS1.19, rHCGS1.20, rHCGS1.36, rHCRG21, rHCTX1, rSMTX1 и rSMTX1_A49E проводили на мышах линии CD-1. Было установлено, что рекомбинантные пептиды, растворенные в 100 мкл физиологического раствора, при введении внутривенно не оказывают острого токсического действия в концентрациях до 5 мг/кг включительно.

Тестирование пептидов rHCTX1, rSMTX1 и rSMTX1_A49E на крабах показало, что они не оказывают токсического действия в концентрации до 5 мг/кг включительно, в отличие от токсина SHTXIII, который парализует крабов с $ED_{50} = 183$ мкг/кг (Honma et al., 2008).

Электрофизиологический анализ пептидов

Для определения спектра биологических мишеней нативных и рекомбинантных пептидов было изучено их влияние на активность восьми субтипов потенциал-зависимых калиевых каналов ($K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v1.3$, $K_v1.4$, $K_v1.5$, $K_v1.6$, hERG, Shaker IR) и TRPV1 рецептора, экспрессированных в ооцитах *Xenopus laevis*. В результате электрофизиологических исследований было установлено, что два пептида, HCRG1 и HCRG2(=HMRG1), модулируют K_v (рис. 9), пептид rHCRG21 – рецептор TRPV1 (рис. 11).

Пептиды HCRG1 и HCRG2 – блокаторы $K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v1.3$, $K_v1.6$ и Shaker IR

Электрофизиологические исследования показали, что пептиды HCRG1 и HCRG2 ингибируют активность потенциал-зависимых K^+ каналов млекопитающих ($K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v1.3$, $K_v1.6$) и насекомых (Shaker IR) (рис. 9 А). Необходимо отметить, что HCRG1 и HCRG2 являются первыми пептидами Кунитц-типа актиний, для которых показано, что они блокируют $K_v1.3$. Для установления количественных характеристик модулирующего действия HCRG1 и HCRG2 было проведено тестирование проводимости K_v при действии на них различных концентраций пептидов. Было установлено, что HCRG1 блокирует $K_v1.3$ более избирательно, чем HCRG2 (рис. 9 Б, табл. 2). Так, HCRG2 блокирует различные изоформы каналов в близком диапазоне концентраций, в то время как разница концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}) различных субтипов потенциал-зависимых калиевых каналов пептидом HCRG1 больше в 3–300 раз, чем для $K_v1.3$ (табл. 2; результаты, полученные в данной работе, показаны на сером фоне).

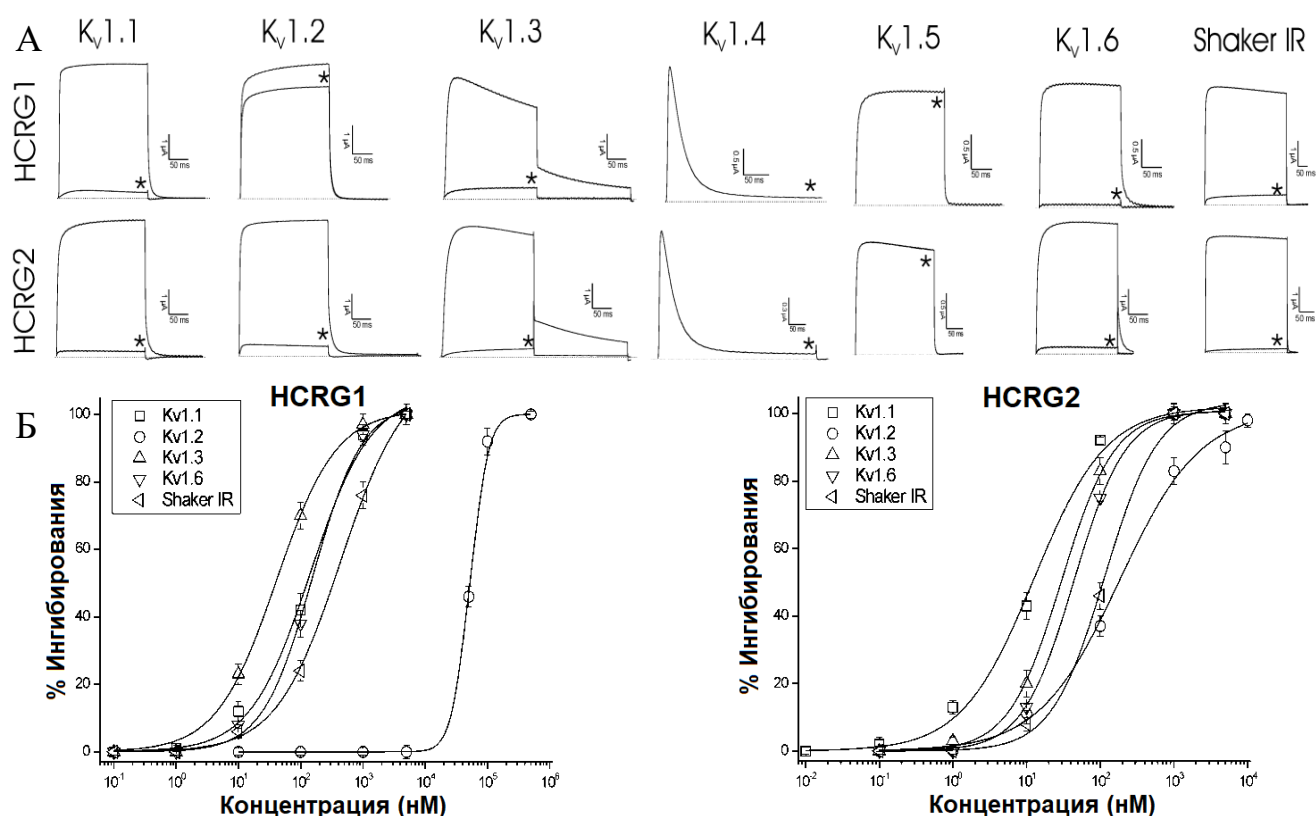


Рисунок 9 – (А) Электрофизиологический анализ модулирующего действия HCRG1 и HCRG2 на различные изоформы K_v , экспрессированные в ооцитах *X. laevis*. (*) – состояние постоянного тока после добавления пептидов в концентрации 1 мкМ. (Б) Концентрационная зависимость действия HCRG1 и HCRG2 на $K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v1.3$, $K_v1.6$ и Shaker IR. Представленные данные являются результатом как минимум трех независимых экспериментов ($n \geq 3$).

Таблица 2 – Концентрации полумаксимального ингибирования калиевых каналов пептидами Кунитц-типа ядовитых животных

Пептид	IC ₅₀ (нМ)				
	$K_v1.1$	$K_v1.2$	$K_v1.3$	$K_v1.6$	Shaker IR
HCRG1	142,6 ± 28,1	52199,0 ± 2751,7	40,7 ± 4,1	154,9 ± 20,4	433,1 ± 43,9
HCRG2	12,6 ± 1,72	181,7 ± 38,5	29,7 ± 1,3	43,9 ± 1,3	114,9 ± 13,9
ShPI-1	117±15	9±2	-	9±2	-
АРЕКТx1	0,9	-	-	-	-
AsKC1	-	2800	-	-	-
AsKC2	-	1100	-	-	-
AsKC3	-	1300	-	-	-
SHTXIII	270*	270*	-	-	-
DTX-α	1,1	0,4	-	9	-
DTX1	3,1	0,13	±	-	-
DTX K	0,03	-	-	-	-
Conk-S1	-	-	-	-	60
LmKTT-1a	-	-	>1000	-	-
Hg1	-	-	6,2	-	-
HWTX-XI	-	-	2,6 × 10 ⁵	-	-

*По результатам вытеснения I¹²⁵-DTX-α токсином SHTXIII (на K⁺ каналах синапсом крысы).

Среди известных токсинов Кунитц-типа, продуцируемых ядовитыми животными (табл. 2, рис. 10), HCRG1 и HCRG2 оказались наименее селективными по отношению к изоформам $K_v1.x$. Токсины Кунитц-типа таких наземных ядовитых животных, как змеи и скорпионы, более селективны и, как правило, модулируют целевую изоформу K_v в меньших

концентрациях (табл. 2). Токсины Кунитц-типа актиний, в отличие от большинства токсинов змей, сохранили способность ингибировать протеиназы. Установлено, что ингибиторы протеиназ, входящие в состав ядов, приводят к пролонгации токсического действия на организм жертвы (Ma et al., 2016). Помимо этого, ингибирование протеиназ в организме жертвы вызывает дополнительные токсические эффекты, не связанные с модуляцией K_v . Так, токсин Кунитц-типа BF9, выделенный из яда змеи *Bungarus fasciatus*, блокирует $K_v1.3$ и ингибирует сериновую протеиназу, фактор свертывания крови XIa, и обладает, таким образом, дополнительным антикоагулянтным действием (Ding et al., 2018).

	1	Cys ^I ₁₀	P120	30	40	50	Cys ^V	Cys ^{VI}	68	%							
HCRG1	----	RGIC	SEPKVVGPC	KAGLR	RFYYD	SETGE	CLPFI	YGGCKGNK	NNFETLHAC	RGICRA	-----100						
HCRG2	----	RGIC	LEPKVVGPC	KARIR	RFYYD	SETGK	CTPFI	YGGCGGNG	NNFETLHAC	RGICRA	-----87						
SHPI-1	----	SIC	SEPKVGR	CKGYF	PRFYD	SETGK	CTPFI	YGGCGGNG	NNFETLHQC	CRATCRA	-----74						
HCGS 1.19	----	G	SIC	LEPKVGR	CRGSF	PRFYD	SETGK	CTPFI	YGGCGGNG	NNFETLHAC	CRATCRA	-----71					
HCGS 1.20	----	G	SIC	LEPKVVGPC	KARIR	RFYYD	SETGK	CTPFI	YGGCGGNG	NNFETLHAC	CRATCRA	-----80					
APEKTx1	---	IN	SIC	LLPKKQGF	CRARF	PRFYD	SSSTR	RCMEFY	YGGCGGNG	NNFETLEEC	CKVCLGYGEAWKAP	50					
SHTXIII	TEEMP	ALCHL	QPDV	PKCRGYF	PRYYYN	PEVGK	CEQFI	YGGCGGNG	KNNFVSFEAC	CRATCIIPL	-----44						
HCTX1	TEELP	ALCRL	QPVAG	KCRGYF	PRYYYN	PEVGK	CEQFI	YGGCGGNG	KNNFVSFEAC	CRATCIIPL	-----48						
SMTX1	TEELP	ALCRL	QPVVG	KCRGYF	PRYYYN	PEAGK	CEQFI	YGGCGGNG	KNNFVSFEAC	CRATCIIPL	-----48						
SMTX1A49E	TEELP	ALCRL	QPVVG	KCRGYF	PRYYYN	PEAGK	CEQFI	YGGCGGNG	KNNFVSFEAC	CRATCIIPL	-----50						
AsKC1	---	IN	KDCLL	PM	MDVGR	CRASH	PRYYYN	SSSKR	CEKFI	YGGCGRGN	NNFHTLEEC	CKVCGVR	-----46				
AsKC2	---	IN	KDCLL	PM	MDVGR	CRARH	PRYYYN	SSSR	CEKFI	YGGCGRGN	NNFITKKEC	CKVCGVR	-----44				
AsKC3	---	IN	GDCLL	PM	MDVGR	CRARF	PRYYYN	LSRR	CEKFI	YGGCGGNG	NNFHTLEEC	CKVCGVRS	-----50				
DTX1	-QPLR	KLCL	ILHR	NPGRCYQ	KIPAF	YYNQ	KKKQ	CEGFT	WSGCGGNS	NRFKTIEEC	CRRTCIRK	-----42					
DTX-α	-QPRR	KLCL	ILHR	NPGRCYD	KIPAF	YYNQ	KKKQ	CERFD	WSGCGGNS	NRFKTIEEC	CRRTCIG	-----33					
DTX K	---	AAKY	CKLPL	RIGPCK	RKIP	SFYK	WAKQ	CLPFD	YSGCGGNG	NRFKTIEEC	CRRTCVG	-----33					
DTX-δ	---	AAKY	CKLPL	RYGPGCK	KKIP	SFYK	WAKQ	CLPFD	YSGCGGNG	NRFKTIEEC	CRRTCVG	-----43					
HWTX-XI	----	IDT	CRLP	SDRGR	CKAS	FERWY	FNG--	RTCA	KFIYGG	CGGNGK	NKFPTQ	EACMKRC	AKA	-----42			
Hg1	GHNHR	VNCLL	PPKT	GPCKGS	FAFY	YFDI	ETGS	CKAFI	YGGCEGNS	NNFSEKHN	CEKRC	RGFRKFGGK	-----51				
LmKTT-1a	----	KKC	QLP	SDVGK	GA	SFTRY	YYNE	ESGK	CE	TFIYGG	VGGNSN	NFLTKE	DCRE	CAQGS	-----45		
Conk-S1	-KDRP	SLCDL	PADSG	SGTKA	EKRI	YNS	ARKQ	CLRF	DYTG	QGGN	NNFR	RTYD	CRTCLYT	-----33			
BPTI	---	RPD	FCLE	PPYT	GPCK	KARI	IRFY	NAK	AGLC	QTEF	YVGG	CR	AKRN	NFEKSA	EDCMRT	CGGA	-----39

			Реактивный сайт														

Реактивный сайт

Сайт слабых взаимодействий

Рисунок 10 – Выравнивание АП пептидов Кунитц-типа, блокаторов K_v и БПТИ (BPTI): АРЕКТх1 (P61541) из актинии *A. elegantissima*, AsKC1–AsKC3 (Q9TWG0, Q9TWF9, Q9TWF8) из актинии *A. sulcata*, ShPI-1 (P31713) из актинии *S. helianthus*, SHTXIII (B1B5I8) из актинии *S. haddoni*, HCRG1, HCRG2, rHCGS1.19, rHCGS1.20, HCTX1 из актинии *H. crispa*, SMTX1, SMTX1A49E из *S. mertensii*, HWTX-XI (P68425) из паука *O. huwena*, LmKTT-1a (P0DJ46) из скорпиона *L. mucronatus*, Hg1 (P0C8W3) из скорпиона *H. gertschi*, DTX1 (P00979) и DTX-K (P00981) из змеи *Dendroaspis polylepis*, DTX-α (P00980) и DTX-δ (P00982) из змеи *Dendroaspis angusticeps*, Conk-S1 (P0C1X2) из моллюска *Conus striatus*, BPTI (P00974) из *B. taurus*. Идентичные а.о. показаны на темно-сером фоне, консервативные – на светло-сером. Гидрофобные остатки выделены зеленым цветом, положительно заряженные – синим, отрицательно заряженные – красным, полярные не заряженные – розовым. Рамками выделены участки АП, предположительно отвечающие за взаимодействие с K_v .

В последовательностях пептидов HCRG1 и HCRG2, в отличие от таковых пептидов Кунитц-типа AsKC1 и AsKC2 из *A. sulcata*, отсутствуют функционально значимые для взаимодействия с K_v каналами диады а.о. Lys5/Leu9, типичные для дендротоксинов змей (DTX1, DTX-K, DTX-α, DTX-δ) (рис. 10). Это свидетельствует о том, что функции данной диады могут распределяться между другими аминокислотными остатками молекулы, как ранее предполагалось для пептидов АРЕКТх1, SHTXIII и ShPI-1 из актиний *A. elegantissima*, *S. haddoni* и *S. helianthus* соответственно (García-Fernández et al., 2016). Функционально значимые аминокислотные остатки в последовательностях токсинов Кунитц-типа, выделенных из актиний и других ядовитых животных, расположены в N- и C-концевых участках молекулы, в частности вокруг Cys^I и Cys^V–Cys^{VI} соответственно. Данные

аминокислотные остатки формируют поверхность молекулярного распознавания для взаимодействия с K_v , благодаря сохранению консервативной дисульфидной связи Cys^I–Cys^{VI}, сближающей N- и C-концевые участки молекулы. Таким образом, за активность HCRG1 и HCRG2 могут отвечать а.о. Gly2, Ser5/Leu5, Pro7, Arg51, Gly52. Боковая цепь Arg1, аналогично Arg5 пептида Hg1, а также Arg4 пептидов DTX1 и DTX- α может вносить значительный вклад в связывание с K_v . Однако полученные нами пептиды gHCGS1.19 и gHCGS1.20, АП которых имеют те же аминокислотные остатки в указанных позициях, что и HCRG1, HCRG2 и ShPI-1, не модулируют K_v . По-видимому, в их АП находятся остатки, затрудняющие взаимодействие с данными субтипами K_v и, возможно, делающие их специфичными к другим субтипам. Аналогичная ситуация наблюдается для пептидов gHCTX1, gSMTX1 и gSMTX1_A49E, не блокирующих K_v , несмотря на то, что их аминокислотные последовательности, высокоидентичные (90%) последовательности токсина SHTXIII, блокирующего K_v , имеют аналогичные остатки в функционально значимых позициях (рис. 10). Структурно-функциональные исследования с привлечением метода сайт-направленного мутагенеза позволят в дальнейшем определить функциональную значимость а.о. Arg1, Gly2, Ser5/Leu5, Pro7, Arg51, Gly52 пептидов HCRG1 и HCRG2 для взаимодействия с потенциал-зависимыми K^+ каналами.

Пептид HCRG21 – полный антагонист TRPV1

В данной работе был проведен электрофизиологический анализ модулирующего действия пептида gHCRG21 на активность TRPV1, экспрессированного в ооцитах *X. laevis*. При добавлении 1 мкМ агониста, капсаицина, вызывающего активацию канала, фиксировали появление неселективных входящих токов, после чего к активированным каналам добавляли антагонист, капсазепин, что вызывало закрытие канала и возвращение токов к нулевым значениям (рис. 11 А). Добавление gHCRG21 не влияло на функционирование TRPV1 и на его дальнейшую активацию капсаицином. Однако совместная аппликация капсаицина и gHCRG21 (10 мкМ) приводила к ингибированию возникающих токов на $59,3 \pm 4,3\%$ (рис. 11 Б). Для определения количественных характеристик модулирующего действия gHCRG21 на TRPV1 было проведено тестирование активности пептида при его добавлении в различных концентрациях. Было установлено, что в концентрации 100 мкМ gHCRG21 ингибирует ток ионов на 95%, а в концентрации (IC_{50}) 6,9 мкМ наблюдается 50% ингибирование TRPV1 (рис. 11 В).

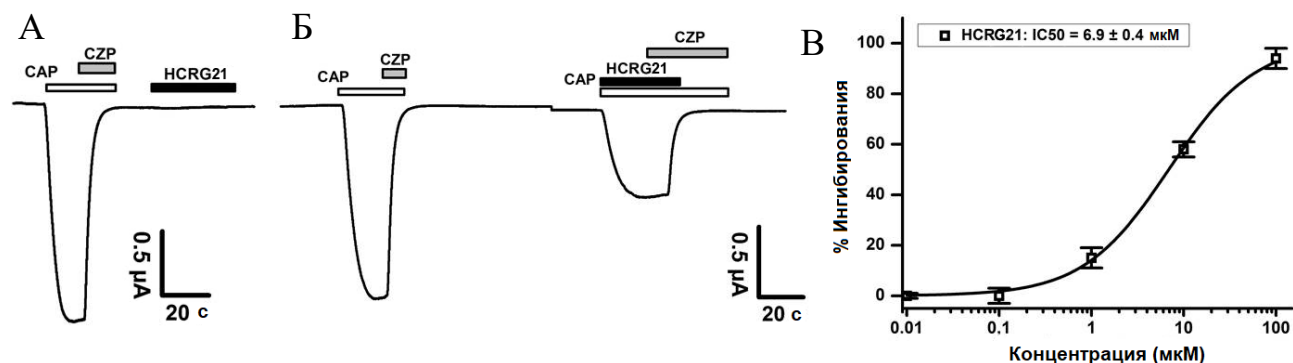


Рисунок 11 – Электрофизиологический анализ ингибирующего действия пептида gHCRG21 на TRPV1. (А) Оценка активности TRPV1 в контрольных условиях и в присутствии gHCRG21 (10 мкМ). (Б) Оценка проводимости TRPV1 при коаппликации капсаицина (CAP) (2 мкМ) с gHCRG21 (10 мкМ). Капсазепин (CZP) (10 мкМ) использован в качестве стандартного антагониста. (В) Определение концентрационной зависимости ингибирующего действия gHCRG21 на активность TRPV1. Представленные данные являются результатом как минимум трех независимых экспериментов ($n \geq 3$).

Ингибирование TRPV1 пептидом APHC1 из *H. crista*, изученное в аналогичных условиях, достигало 32% при концентрации 1 мкМ; величина полумаксимальной эффективной концентрации (EC_{50}) составляла 54 ± 4 нМ (Andreev et al., 2008) P1(табл. 3; результаты, полученные в данной работе, показаны на сером фоне). Таким образом, rHCRG21 является первым полным пептидным антагонистом TRPV1. Действующие концентрации rHCRG21 оказались значительно выше, чем у APHC1. Однако K_i трипсина пептида rHCRG21 на порядок ниже, чем пептида APHC1. Различная эффективность ингибирования токов через TRPV1 пептидами rHCRG21 и APHC1 (95% и 32% соответственно) обусловлена, по-видимому, различиями между функционально значимыми остатками в аминокислотных последовательностях. Ранее на основании экспериментальных данных, *in vitro* и *in silico* (Nikolaev et al., 2017), было высказано предположение, что функционально значимыми для взаимодействия APHC1 с TRPV1 являются а.о. Lys28, Glu45, Arg48, Arg51 и Arg55 (рис. 12). Эти же остатки сохраняются в последовательности HCRG21, но точечная замена Val31Pro, по видимому, привела к конформационным изменениям (за счет структурного излома молекулы, обусловленного остатком пролина) и формированию контактной поверхности, отличной от таковой пептида APHC1. Различия в эффективности действия пептидов APHC1 и HCRG21 на TRPV1 можно объяснить заменой Val31Pro, однако для подтверждения данных предположений требуется проведение структурно-функциональных исследований с привлечением метода сайт-направленного мутагенеза.

Таблица 3 – Сравнение активности пептидных антагонистов TRPV1

Пептид	Ингибирование TRPV1, %	Концентрация, мкМ	K_i трипсина, мкМ
rHCRG21	50%	6,9	0,2
	95%	100	
APHC1	16%	0,054	1
	32%	1	

	1	10	P1	20	30	40	58	%
HCRG21	-RGICSEPKVVGPC	TAYFRRFYFDSET	GGKCTPFI	YGGCEGNGN	NFETLRACRA	ICRA-		100
APHC1	-GSICLEPKVVGPC	TAYFRRFYFDSET	GGKCTVFI	YGGCEGNGN	NFETLRACRA	ICRA-		93
APHC2	-GSICLEPKVVGPC	TAYFRRFYFDSET	GGKCTPFI	YGGCEGNGN	NFETLRACRA	ICRA-		95
APHC3	-GSICLEPKVVGPC	TAYFRRFYFDSET	GGKCTPFI	YGGCEGNGN	NFETLRACRA	ICRA-		89
HCGS 1.10	-GSICLEPKVVGPC	TAYLRRFYFDSET	GGKCTPFI	YGGCEGNGN	NFETLRACRA	ICRA-		93
HCGS 1.36	-GSICLEPKVVGPC	TAYFRRFYFDSET	GGKCTPFI	HGGCEGNGN	NFETLRACRA	ICRA-		91
InhVJ	-GSICLEPKVVGPC	TAYFRRFYFDSET	GGKCTPFI	YGGCEGNGN	NFETLRACRA	ICRA-		91
BPTI	RPDFCLEPPTGPK	KARIIRYFYNAK	AGLCQTFVYGG	CRAKRNNFK	SAEDCMRT	CGGA		36
	*****				*****			
	Реактивный сайт				Сайт слабых взаимодействий			

Рисунок 12 – Выравнивание АП пептидов Кунитц-типа *H. crista*: HCRG21, APHC1 (B2G331), APHC2 (C0HJF4), APHC3 (C0HJF3), InhVJ (P0DMJ5), HCGS1.10, HCGS1.36, а также BPTI (P00974) из *B. taurus*. Идентичные а.о. показаны на темно-сером фоне, консервативные – на светло-сером.

Точечные замены в АП пептидов rHCGS1.10 и rHCGS1.36 обусловили отсутствие модулирующего действия на TRPV1. Возможно, данные пептиды способны взаимодействовать с другими представителями семейства рецепторов TRP или усиливать активность антагонистов TRPV1. Подобные закономерности были отмечены ранее для токсинов пауков и скорпионов (Wullschlegel et al., 2004). Для проверки данных предположений требуется провести электрофизиологическое исследование сочетанного действия пептидов на TRPV1, а также тестирование их активности по отношению к другим представителям семейства рецепторов TRP.

Исследование взаимодействия нативных и рекомбинантных пептидов Кунитц-типа *H. crispus* с молекулярными мишенями показало, что все полученные пептиды ингибируют трипсин, при этом некоторые из них являются полифункциональными, они модулируют также ионные каналы. Так, HCRG1 и HCRG2 с *Lys* в положении P1 реактивного сайта блокируют K_v млекопитающих и насекомых. Другой пептид, rHCRG21 с *Thr* в положении P1, модулирует TRPV1 и является его полным антагонистом.

Влияние пептидов на продукцию провоспалительных медиаторов

Многие заболевания сопровождаются воспалительным процессом, для лечения и предупреждения которого требуются соединения, способные подавлять активность ферментов или модулировать ионные каналы и рецепторы. Было показано, что пептиды HCRG1 и HCRG2 уменьшают синтез провоспалительных медиаторов, проИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α (рис. 13), индуцированный добавлением ЛПС бактерий. С одной стороны, данные эффекты могут достигаться за счет ингибирования протеиназ. Подобным действием обладает пептид Кунитц-типа человека, бикунин, ингибирующий продукцию тромбоксана Б2, ФНО- α и ИЛ-8 в макрофагах, обработанных ЛПС (Shigetomi et al., 2010). С другой стороны, к снижению уровня экспрессии провоспалительных медиаторов также приводит блокирование K_v 1.3. Так, ранее было обнаружено, что при обработке аутореактивных Т-лимфоцитов блокатором K_v 1.3, токсином ShK-186, происходит уменьшение экспрессии ИЛ-2, интерферона- γ , ФНО- α и ИЛ-4 (Chi et al., 2012). Таким образом, противовоспалительный эффект пептидов HCRG1 и HCRG2 может быть связан с действием как на протеиназы, так и на K_v 1.3 канал.

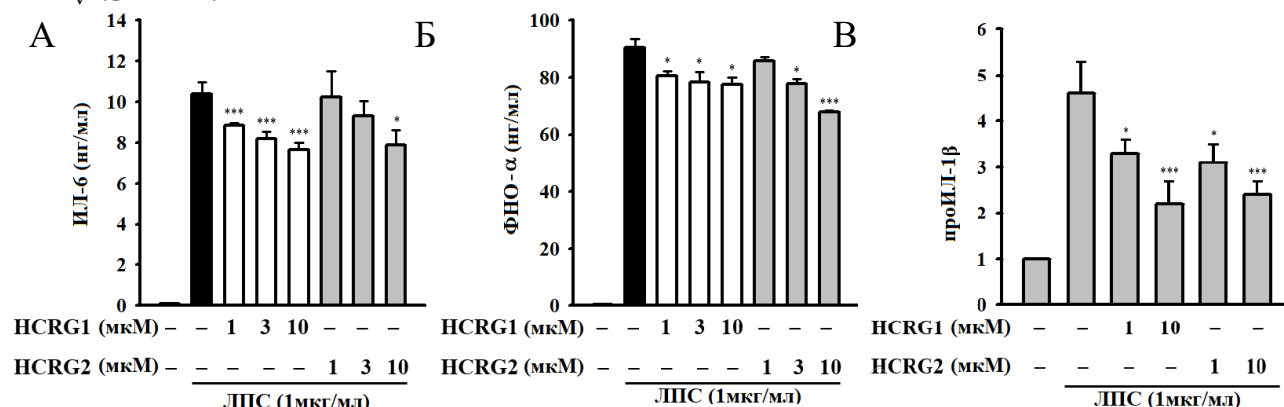


Рисунок 13 – Влияние пептидов HCRG1 и HCRG1 на образование ИЛ-6 (А) и ФНО- α (Б) в макрофагах RAW 264.7 и на образование проИЛ-1 β (В) макрофагах J774A.1 в результате стимуляции ЛПС. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (n=4). * $p < 0,05$.

Влияние пептидов на развитие окислительного стресса

Исследование способности пептидов Кунитц-типа ингибировать развитие окислительного стресса проводили на линии макрофагов мыши RAW 264.7. Инкубация макрофагов RAW 264.7 в присутствии ЛПС в течение 24 ч приводила к увеличению продукции АФК и NO. Добавление пептидов rHCGS1.10, rHCGS1.19, rHCGS1.20, rHCGS1.36 и rHCTX1 в концентрациях 0,01–10 мкМ достоверно понижало содержание АФК и NO (рис. 14), в том числе до контрольных значений. Вероятно, исследуемые пептиды, подобно БПТИ, ингибируют активность iNOS или же протеиназ, вовлеченных в воспалительный процесс (Beierlein et al., 2005; Day et al., 2006).

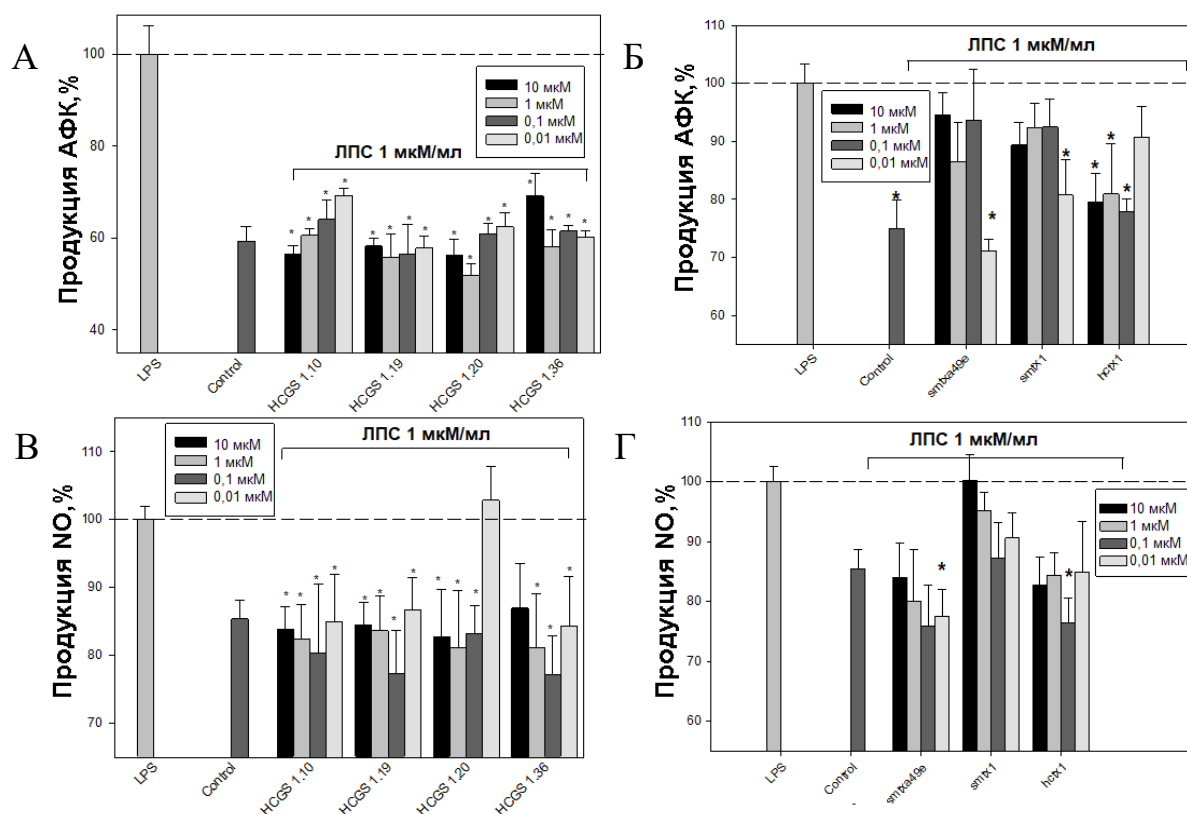


Рисунок 14 – Влияние пептидов на образование АФК (А, Б) и NO (В, Г) в результате стимуляции макрофагов RAW 264.7 бактериальным ЛПС (LPS 1 мкМ/мл). Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (n=4). * $p < 0,05$.

Антигистаминная активность пептидов

Одним из начальных этапов процесса воспаления является высвобождение гистамина из тучных клеток. В данной работе антигистаминную активность исследуемых пептидов оценивали по их влиянию на внутриклеточную концентрацию ионов кальция $[Ca^{2+}]_i$ в клетках макрофагов. В качестве контроля в экспериментах использовали блокатор H1-гистаминовых рецепторов, фексофенадин. Было установлено, что пептиды rHCSS1.19, rHCSS1.20, rHCSS1.36 (рис. 15 А), rHCTX1 и rSMTX1_A49E (рис. 15 Б), в концентрациях 1 и 10 мкМ, обладают достоверной антигистаминной активностью.

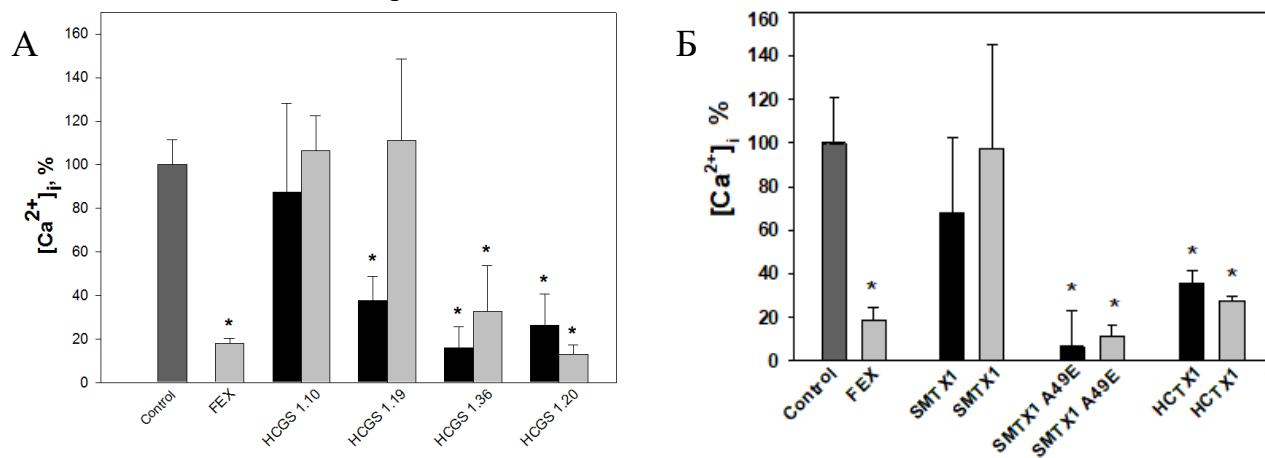


Рисунок 15 – Влияние гистамина (control, 50 мкМ), фексофенадина (FEX, 10 мкМ) и пептидов (А) rHCSS1.10, rHCSS1.19, rHCSS1.20 и rHCSS1.36, (Б) rHCTX1, rSMTX1 и rSMTX1_A49E в концентрациях 10 мкМ (черные столбцы) и 1 мкМ (серые столбцы) на $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах костного мозга мыши. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (n=4). * $p < 0,05$.

Наиболее активными оказались пептиды rSMTX1_A49E и rHCGS1.20, в концентрации 1 мкМ они снижали $[Ca^{2+}]_i$ на 85%. Данный эффект пептидов был равен эффекту фексофенадина. Антигистаминное действие пептидов может являться результатом как блокирования H1-гистаминовых рецепторов, так и следствием реакций, опосредованных взаимодействием пептидов с G-белками, или же ингибированием потенциал-зависимых кальциевых каналов (Ca_v) каналов эндоплазматического ретикулума. На сегодняшний день уже известен пептид Кунитц-типа, модулирующий рецепторы, связанные с G-белками (рецептор вазопрессина второго типа AVPR2) (Ciolek et al., 2017), а также пептид, модулирующий Ca_v каналы (Stotz et al., 2000).

Впервые показано, что пептиды Кунитц-типа актиний способны ингибировать синтез провоспалительных медиаторов, подавлять развитие окислительного стресса, а также блокировать действие гистамина. Данные эффекты могут являться результатом взаимодействия пептидов с протеиназами и ионными каналами или же с ферментами NADPH-оксидазной системы, iNOs, H1-гистаминовым рецептором и другими. В дальнейшем планируется выяснить молекулярный механизм противовоспалительного действия пептидов Кунитц-типа актиний, исследуемых в данной работе.

Выводы

1. В результате протеомного анализа установлено, что ингибиторы протеиназ Кунитц-типа являются, наряду с нейро- и α -пороформирующими токсинами, главными компонентами ядовитого секрета актинии *Heteractis magnifica* и формируют комбинаторную библиотеку, основные (мажорные) изоформы которой идентичны таковым актинии *Heteractis crispa*.
2. Из актинии *H. crispa* выделено два новых ингибитора протеиназ Кунитц-типа, HCRG1 и HCRG2, с K_i трипсина 28 и 50 нМ соответственно. Установлены аминокислотные последовательности пептидов, степень идентичности которых с известными последовательностями пептидов Кунитц-типа *H. crispa* составляет 75–77%.
3. Показано, что HCRG1 и HCRG2 блокируют некоторые субтипы потенциал-зависимых калиевых каналов млекопитающих ($K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v1.3$, $K_v1.6$) и насекомых (Shaker IR). Значения концентрации полумаксимального ингибирования каналов пептидами зависят от субтипа K_v и составляют от 40 нМ до 52 мкМ для HCRG1 и от 12 до 181 нМ для HCRG2.
4. Получено восемь рекомбинантных представителей дивергентных групп пептидов Кунитц-типа актиний семейства Stichodactylidae, K_i трипсина которых варьируют в диапазоне значений от 20 до 200 нМ.
5. Установлено, что рекомбинантный пептид HCRG21 является полным антагонистом TRPV1, значение концентрации полумаксимального ингибирования рецептора составляет 6,9 мкМ.
6. Показано, что некоторые исследованные пептиды Кунитц-типа в микромолярных концентрациях ингибируют синтез провоспалительных медиаторов и подавляют развитие окислительного стресса в ЛПС-активированных макрофагах, а также проявляют антигистаминную активность *in vitro*, что указывает на их выраженный фармакологический потенциал.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи в рецензируемых журналах

1. Gladkikh I., Monastyrnaya M., Zelepuga E., **Sintsova O.**, Tabakmakher V., Gnedenko O., Ivanov A., Hua K-F., Kozlovskaya E. New HCRG-polypeptides of Kunitz-Type from the sea anemone, *Heteractis crispa* // Marine Drugs. 2015. V. 13. P. 6038–6063.
2. **Синцова О.В.**, Монастырская М.М., Пислягин Е.А., Менчинская Е.С., Лейченко Е.В., Аминин Д.Л., Козловская Э.П. Противовоспалительная активность полипептида актинии *Heteractis crispa* // Биоорганическая химия. 2015. Т. 41, № 6. С. 657–663.
3. Monastyrnaya M., Peigneur S., Zelepuga E., **Sintsova O.**, Gladkikh I., Leychenko E., Isaeva M., Tytgat J., Kozlovskaya E. Kunitz-type peptide HCRG21 from the sea anemone *Heteractis crispa* is a full antagonist of the TRPV1 receptor // Marine Drugs. 2016. V. 14. P. 229 [1–20].
4. **Синцова О.В.**, Пислягин Е.А., Гладких И.Н., Монастырская М.М., Менчинская Е.С., Лейченко Е.В., Аминин Д.Л., Козловская Э.П. Пептиды Кунитц-типа актинии *Heteractis crispa* потенциальные противовоспалительные соединения // Биоорганическая химия. 2017. Т. 43, №1. С. 105–112.
5. **Sintsova O.**, Gladkikh I., Chaousova V., Monastyrnaya M., Anastuyuk S., Chernikov O., Yurchenko E., Aminin D., Isaeva M., Leychenko E., Kozlovskaya E. Peptide fingerprinting of the sea anemone *Heteractis magnifica* mucus revealed neurotoxins, Kunitz-type proteinase inhibitors and a new β -defensin α -amylase inhibitor // Journal of Proteomics. 2018. V. 173. P. 12–21.

Материалы конференций

6. **Синцова О.В.**, Табакмахер В.М., Терентьева А.А., Схабюк В.П., Монастырская М.М., Козловская Э.П. Новый анальгетический полипептид Кунитц-типа актинии *Heteractis crispa* // VI Международная школа молодых ученых по молекулярной генетике «Геномика и системная биология», Россия, Москва – Звенигород, 16–21 нояб. 2014. С. 41
7. **Sintsova O.V.**, Chaousova V.E., Gladkikh I.N., Isaeva M.P., Tabakmakher V.M., Leychenko E.V., Monastyrnaya M.M., Pisyagin E.A., Menchinskaya E.S., Peigneur S., Tytgat J., Kozlovskaya E.P. New antihistamine Kunitz-type polypeptides of the sea anemones, *Heteractis crispa* and *Stichodactyla mertensii* // 40th FEBS congress “The Biochemical Basis of Life”, Berlin, Germany, July 4–9, 2015: abstrs., FEBS Journal. 2015. V. 282, suppl. 1. P. 140–141.
8. **Синцова О.В.**, Монастырская М.М., Пислягин Е.А., Менчинская Е.С., Лейченко Е.В., Аминин Д.Л., Козловская Э.П. Противовоспалительная активность полипептида актинии *Heteractis crispa* // VII Российский симпозиум «Белки и пептиды», Новосибирск, 12–17 июля 2015: материалы симп., Новосибирск: ЗАО ИПП «Офсет», 2015. С. 329. ISBN 978-5-85957-115-4.
9. **Sintsova O.V.**, Monastyrnaya M.M., Pisyagin E.A., Yurchenko E.A., Menchinskaya E.S., Leychenko E.V., Isaeva M.P., Aminin D.L., Kozlovskaya E.P. Kunitz-type polypeptides of sea anemones *Heteractis crispa* and *Stichodactyla mertensii* exhibit cytoprotective action // KORUS–2016. “TEAM” Together to Effectively Acting Medicines, Vladivostok, Russia, Aug. 26–31, 2016: [proceeding]. Vladivostok, 2016. P. 53. ISBN 978-5-7442-1581-1.
10. **Синцова О.В.**, Монастырская М.М., Пислягин Е.А., Менчинская Е.С., Юрченко Е.А., Исаева М.П., Лейченко Е.В., Аминин Д.Л., Козловская Э.П. SHTXIII-подобные пептиды Кунитц-типа актиний *Heteractis crispa* и *Stichodactyla mertensii* – потенциальные цитопротекторы // V съезд физиологов СНГ, V съезд биохимиков России, Конференция ADFLIM, Сочи – Дагомыс, Россия, 4–8 окт. 2016 ActaNaturae. 2016. № S-2. С. 149.
11. **Синцова О.В.**, Монастырская М.М., Пислягин Е.А., Менчинская Е.С., Юрченко Е.А., Исаева М.П., Лейченко Е.В., Пеньер С., Титгат Я., Аминин Д.Л., Козловская Э.П. SHTXIII-подобные пептиды Кунитц-типа актиний *Heteractis crispa* и *Stichodactyla mertensii* // Химия и химическое образование: 7-й международный симпозиум, Владивосток, Россия, 17–20 окт. 2017: сб. науч. тр. Владивосток: Изд-во ДВФУ, 2017. С. 38. ISBN 978-5-7444-4121-0.