

На правах рукописи

Кветкина Александра Николаевна

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

02.00.10 – Биоорганическая химия

Автореферат

диссертации на соискание ученой
степени кандидата химических наук

Владивосток – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
«Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова»
Дальневосточного отделения Российской академии наук

Научные руководители:

кандидат химических наук, доцент
Лейченко Елена Владимировна

кандидат медицинских наук, доцент
Исаева Марина Петровна

Официальные оппоненты:

Уткин Юрий Николаевич

доктор химических наук, профессор, Институт
биоорганической химии им. академиков М.М.
Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, главный
научный сотрудник, руководитель лаборатории
молекулярной токсикологии

Шкрыль Юрий Николаевич

кандидат биологических наук, доцент,
Федеральный научный центр биоразнообразия
наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН,
ведущий научный сотрудник лаборатории
бионанотехнологий и биомедицины

Ведущая организация:

Национальный научный центр морской биологии
им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, г. Владивосток

Защита состоится «09» июня 2021 г. в 12 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 « » 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
к.б.н.



Чингизова Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы и степень ее разработанности. 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 токсинологии. 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 кишечнорастворимые — 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 Phe-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.

Цель и задачи исследования. Целью диссертационной 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 использовались программы MEGA, VectorNTI, Modeller, Chimera и MOE. Для расчета статистически достоверных данных использовали метод Стьюдента.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. В транскриптах тканей щупалец актиний *H. crispa* 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.

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

Публикации работы. Основные результаты исследования опубликованы в российских и международных рецензируемых научных журналах «Биоорганическая химия», «Доклады Академии наук», «Scientific Reports» и «Вестник ДВО РАН». Всего по теме диссертации опубликовано 4 научных статьи в журналах, рекомендованных ВАК, и 8 материалов конференций.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитированной

литературы. Работа изложена на 103 страницах машинописного текста, содержит 35 рисунков, 8 таблиц и 231 литературную ссылку.

Благодарности. Автор выражает искреннюю признательность и благодарность научным руководителям к.х.н. Лейченко Е.В. и к.м.н. Исаевой М.П. за руководство и помощь на всех этапах выполнения работы. Автор благодарит сотрудников лаборатории химии пептидов д.х.н. Козловскую Э.П., д.х.н. Монастырную М.М. и к.ф.-м.н. Зелепуга Е.А. за помощь, поддержку и ценные советы при выполнении диссертационной работы. Автор благодарит также сотрудников лаборатории молекулярной фармакологии и биомедицины к.х.н. Гладких И.Н., к.х.н. Чаусову В.Е., к.б.н. Синцову О.В. и м.н.с. Калину Р.С. за помощь в освоении молекулярно-генетических и биохимических методов. Автор благодарит сотрудников лаборатории морской биохимии н.с. Гузева К.В. и м.н.с. Чернышеву Н.Ю. за секвенирование нуклеотидных последовательностей. Автор признателен заведующему лабораторией физико-химических методов исследования к.х.н. Дмитренку П.С. и сотрудникам к.х.н. Анастюку С.Д., н.с. Ким Н.Ю. и м.н.с. Меншову А.С. за помощь в получении масс-, ЯМР- и КД-спектров; заведующему лабораторией неинфекционного иммунитета к.б.н. Черникову О.В. за помощь в секвенировании пептидов; заведующему лабораторией биоиспытаний и механизма действия биологически активных веществ член.-корр. РАН Аминину Д.Л. и сотрудникам к.б.н. Менчинской Е.С., к.б.н. Юрченко Е.А., к.б.н. Пислягину Е.А. за помощь в исследовании цитопротективной активности пептидов. Автор глубоко признателен руководителю лабораторией межмолекулярных взаимодействий Института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича (г. Москва) д.м.н. Иванову А.С. и к.б.н., н.с. Калужскому Л.А. за помощь в проведении биосенсорного анализа. Автор благодарит заведующего лабораторией токсикологии и фармакологии католического института Левена (г. Левен, Бельгия) проф. Титгата Я. (Jan Tytgat) и PhD Пеньера С. (Steve Reigneur) за помощь в проведении электрофизиологических исследований.

Список сокращений. а.о. – аминокислотный остаток; АП – аминокислотная последовательность; АФК – активные формы кислорода; КД – спектроскопия кругового дихроизма; МАЛДИ ВП МС – времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией; НП – нуклеотидная последовательность; н.п. – нуклеотидная пара; ОФ ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ^1H ЯМР – ядерный магнитный резонанс на ядрах атома водорода; K_A – константа ассоциации комплекса; k_a – константа скорости ассоциации; K_D – константа диссоциации комплекса; k_d – константа скорости диссоциации; кДНК – комплементарная ДНК; K_i – константа ингибирования; K_V – потенциал-зависимый калиевый канал; NGS (New Generation Sequencing) – секвенирование нового поколения; TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1) – канал переменного рецепторного потенциала, активируемый ваниллоидами, тип 1; 6-OHDA – 6-гидроксидофамин.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1 Обзор литературы

В данной главе представлены разнообразие и структурно-функциональные особенности пептидов Кунитц-типа ядовитых животных. На основании современных литературных данных описаны мультигенные семейства, кодирующие пептиды Кунитц-типа змей, лягушек, пауков, скорпионов, клещей, моллюсков конусов и актиний. Приведены основные представители каждого семейства и даны их структурно-функциональные характеристики.

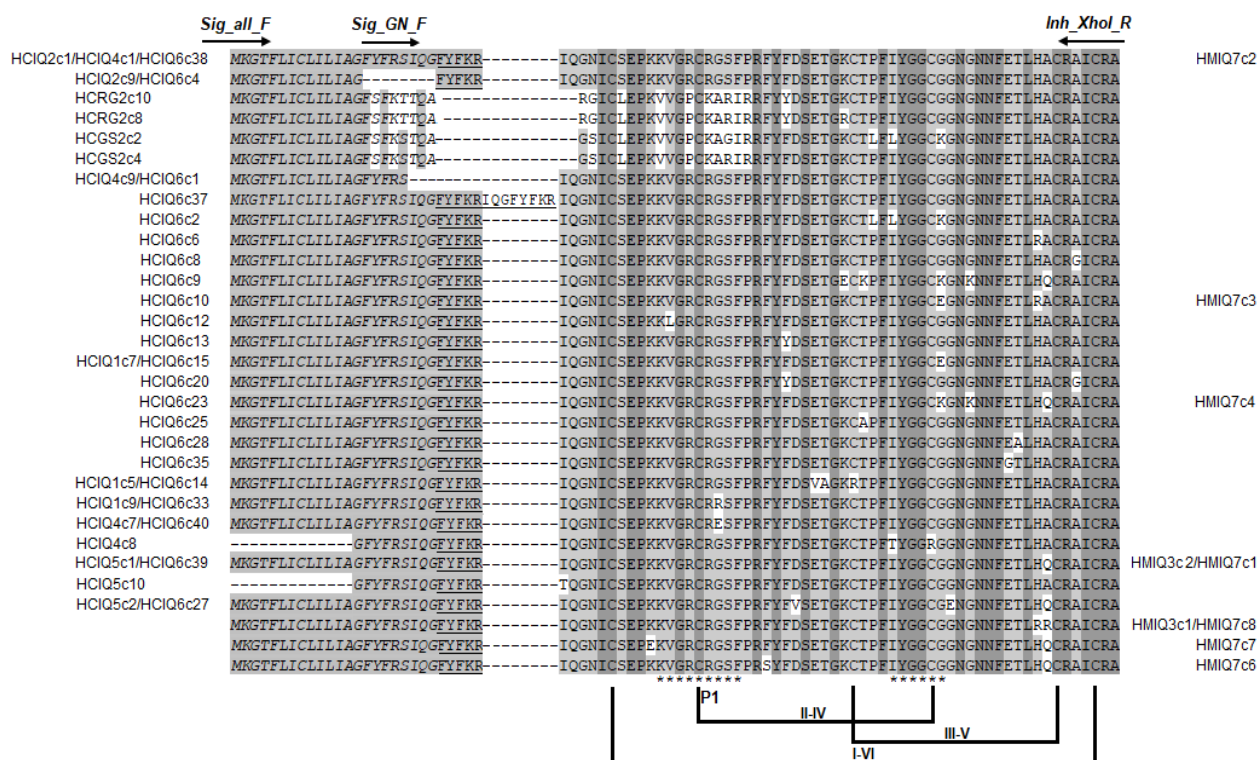
2 Результаты и обсуждение

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

2.1.1 Идентификация последовательностей транскриптов, кодирующих IQ-пептиды

Для идентификации НП, кодирующих IQ-пептиды, были применены подходы с использованием секвенирования по Сенгеру и NGS. Применение первого подхода позволило установить НП, кодирующие 11 изоформ IQ-пептидов *H. crispa* (обозначены как HClQ1c7-HClQ5c10) и две изоформы *H. magnifica* (HMIQ3c1 и HMIQ3c2) (рисунок 1). Выведенные АП предшественников IQ-пептидов включали сигнальный пептид, пропептид с сайтом расщепления Lys-Arg и зрелый пептид. Наиболее представленными изоформами *H. crispa* были HClQ2c1 (=HClQ4c1) (68,75%) и HClQ5c1 (12,5%), тогда как для *H. magnifica* – HMIQ3c2 (80,7%), идентичная HClQ5c1. НП транскрипта HClQ2c9 отличалась от HClQ2c1 отсутствием фрагмента, кодирующего С-концевую последовательность сигнального пептида, а в последовательности HClQ4c9 отсутствовал пропептид-кодирующий фрагмент, подобно транскриптам предшественников HCGS-пептидов, при этом НП, кодирующая зрелый пептид HClQ4c9, оказалась идентичной таковой HClQ2c1 (рисунок 1). Было сделано предположение, что HClQ4c9 является переходной (промежуточной) формой между генами, кодирующими HCGS- и HClQ-пептиды.

В результате применения метода NGS было идентифицировано 22 изоформы HClQ-пептидов (обозначены как HClQ6c1-HClQ6c40) и восемь изоформ HMIQ-пептидов (HClMQ7c1-HClMQ7c8). Наиболее представленными изоформами для *H. crispa* были HClQ6c38 (84,4%), HClQ6c15 (2,5%) и HClQ6c39 (1,5%) (рисунок 2, А), тогда как для *H. magnifica* – HMIQ7c1 (46,6%), HMIQ7c2 (15,5%) и HMIQ7c3 (15,5%) (рисунок 2, Б). Транскрипт HClQ6c37 содержал повтор пропептид-кодирующей области (рисунок 1).



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 1 – Множественное выравнивание последовательностей предшественников пептидов Кунитц-типа актиний

Изоформы HSIQ-пептидов, НП которых получены методом секвенирования по Сенгеру, за исключением HSIQ4c8 и HSIQ5c10, были идентичны изоформам, выведенным из данных NGS ампликонов (рисунок 1). Редкие изоформы в обоих случаях были представлены единичными копиями транскриптов. HMQ7c2, HMQ7c3 и HMQ7c4 соответствовали HSIQ2c1, HSIQ6c10 и HSIQ6c23 (рисунок 1). Уникальными для *H. magnifica* изоформами являлись HMQ7c6 и HMQ7c7, транскрипты которых были обнаружены только при глубоком секвенировании ампликонов. Наиболее представленной изоформой пептидов Кунитц-типа *H. crispa* была HSIQ2c1, тогда как в *H. magnifica* превалировала HMQ7c1 (=HSIQ5c1).

В результате объединения данных было установлено четыре структурных варианта предшественников IQ-пептидов: 1) содержащих пропептид (большинство предшественников HSIQ- и HMQ-пептидов); 2) содержащих tandemный повтор пропептида (HSIQ6c37); 3) не содержащих пропептида (HSIQ4c9); 4) не содержащих С-концевого сигнального участка (HSIQ2c9 и HMQ7c5). Было сделано предположение, что появление пропептид-кодирующего участка в структуре предшественников IQ-пептидов может указывать на их рекруитмент в ядовитый секрет морских анемонов в качестве токсинов.

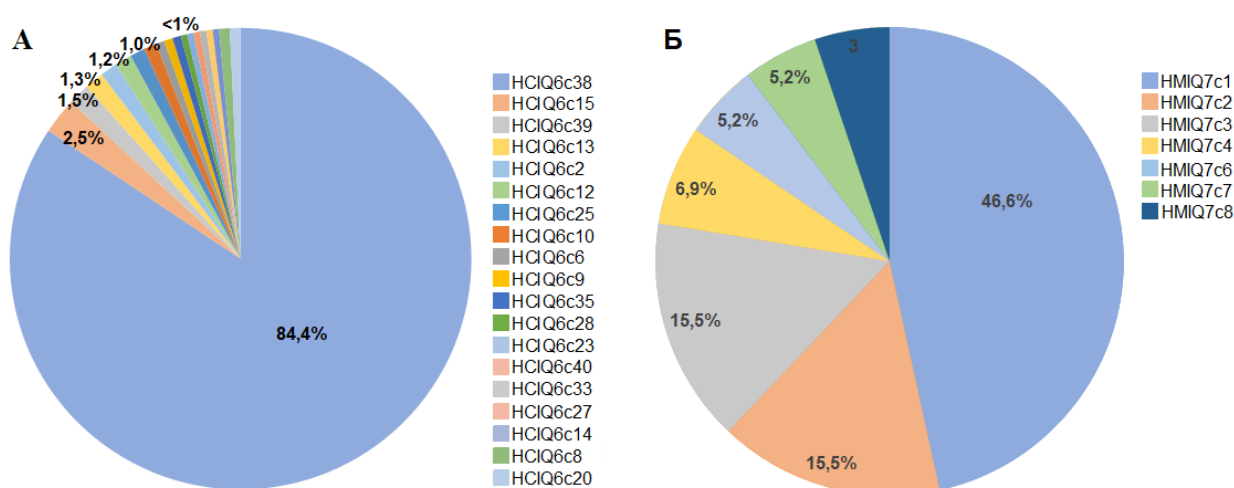


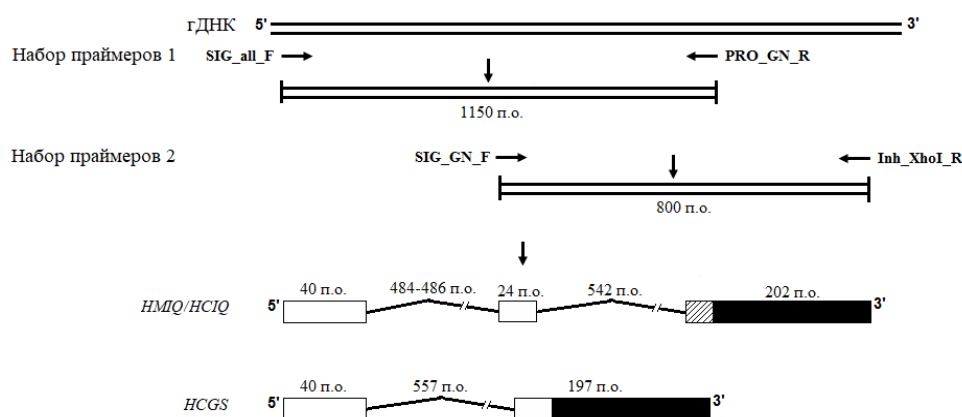
Рисунок 2 – Круговые диаграммы частоты встречаемости HSIQ (А) и HMIQ (Б) изоформ, полученных методом глубокого секвенирования ампликонов (NGS)

Таким образом, применение классических и современных методов молекулярной биологии к идентификации транскриптов, кодирующих пептиды Кунитц-типа актиний *H. crisa* и *H. magnifica*, позволило идентифицировать 24 изоформы HSIQ- и восемь изоформ HMIQ-пептидов. Установлено четыре структуры предшественников IQ-пептидов. Появление последовательности, кодирующей пропептид с сайтом расщепления Lys-Arg, свойственным нейротоксинам и актинопоринам актиний, может указывать на вовлечение IQ-пептидов в состав ядовитого секрета в качестве токсинов.

2.1.2 Установление структурной организации генов IQ-пептидов

В результате амплификации гДНК актиний *H. crisa* и *H. magnifica* с ген-специфичными праймерами, фланкирующими белок-кодирующие участки генов IQ-пептидов, были получены ПЦР-фрагменты примерно одинаковой длины (рисунок 3). Анализ НП показал, 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), тогда как второй интрон отделяет экзон 3, кодирующий про- и зрелый пептид от НП, кодирующей сигнальный пептид (рисунок 3).

Сравнение HSIQ- и HMIQ-интронов показало высокую идентичность НП между собой (99–100%). Степень же идентичности между первым и вторым интроном составила около 60%. НП первого IQ-интрона разделяли 93–95% идентичности между собой и с таковой HCGS-интрона, отличаясь количеством повторяющихся СА-элементов (5–6 повторов). НП второго IQ-интрона были менее консервативны и не содержали СА-повторы. Анализ генов HSIQ- и HMIQ-пептидов показал, что интроны условно разделяют консервативные и вариабельные участки, что характерно для генов токсинов конусов и скорпионов.



Экзоны, кодирующие сигнальный пептид, показаны в виде белых прямоугольников; участки экзона, кодирующие прочась и зрелый пептид, показаны в виде полосатого и черного прямоугольников соответственно. Длины ПЦР-фрагментов показаны под линиями. Длины экзонов и интронов указаны сверху

Рисунок 3 – Схема установления структуры гена HSIQ/HMIQ-пептидов

На основании полной идентичности НП экзона 1, кодирующего сигнальный пептид, и высокой идентичности первого интрона, мы полагаем, что гены IQ- и HCGS-пептидов 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. 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 сделано предположение, что гены IQ-пептидов формируют отдельное подсемейство внутри мультигенного GS-семейства.

2.1.3 Сравнительный анализ изоформ IQ-пептидов

Для IQ-пептидов характерен узкий диапазон расчетных значений молекулярных масс (6258,09–6557,46 Da) и pI (9,78–10,74), но широкий диапазон величины положительного заряда молекулы (+2,82–+6,09), подобно HCGS-пептидам с Lys в P1-положении. 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%).

Степень идентичности между АП IQ- и GS-пептидов составила 73–99%. IQ-пептиды имеют уникальные аминокислотные замены остатков Asn4 и Ser7, по сравнению с таковыми HCGS-пептидов, а также два дополнительных N-концевых остатка Ile1 (Thr1 в случае HSIQ5c10) и Gln2. В АП изоформ IQ-пептидов, так же как и HCGS-пептидов, присутствуют

два сайта связывания с протеазами: сайт сильных взаимодействий в положениях 11–19 и сайт слабых взаимодействий в положениях 35–40 (рисунок 4). Все изоформы IQ-пептидов содержат остаток Arg в положении P1 (IQ-R) в отличие от HCGS-пептидов, у которых в этом положении находятся Arg (HCGS-R), Lys (HCGS-K) и Thr (HCGS-T) (рисунок 4). Аминокислотные остатки сайта сильных взаимодействий IQ-пептидов высоко идентичны HCGS-R пептидам, представителем которых является HCGS1.19, ингибитор трипсина из *H. crista*, и SHPI-1, ингибитор протеаз и блокатор K_v каналов из *Stichodactyla helianthus*. В P1'-положении реактивного сайта IQ-пептидов локализован Gly, за исключением HClQ1c9 и HClQ4c7, у которых в этом положении находятся Arg и Glu соответственно.

	1	20	40	60	
HClQ2c1	---IQGNICSEPKKVGRCRGSFPRFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNFFETLHACRAICRA				
HClQ5c1	---IQGNICSEPKKVGRCRGSFPRFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNFFETLHACRAICRA				
HClQ5c10	---IQGNICSEPKKVGRCRGSFPRFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNFFETLHACRAICRA				
HClQ1c9	---IQGNICSEPKKVGRCRGSFPRFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNFFETLHACRAICRA				
HClQ4c7	---IQGNICSEPKKVGRCRGSFPRFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNFFETLHACRAICRA				
HClQ4c8	---IQGNICSEPKKVGRCRGSFPRFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNFFETLHACRAICRA				
HClQ1c5	---IQGNICSEPKKVGRCRGSFPRFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNFFETLHACRAICRA				
HClQ5c2	---IQGNICSEPKKVGRCRGSFPRFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNFFETLHACRAICRA				
HClQ6c2	---IQGNICSEPKKVGRCRGSFPRFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNFFETLHACRAICRA				
HClQ6c9	---IQGNICSEPKKVGRCRGSFPRFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNFFETLHACRAICRA				
HClQ6c23	---IQGNICSEPKKVGRCRGSFPRFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNFFETLHACRAICRA				
HClQ1c7	---IQGNICSEPKKVGRCRGSFPRFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNFFETLHACRAICRA				
HClQ6c10	---IQGNICSEPKKVGRCRGSFPRFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNFFETLHACRAICRA				
HClQ6c6	---IQGNICSEPKKVGRCRGSFPRFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNFFETLHACRAICRA				
HMIQ3c1	---IQGNICSEPKKVGRCRGSFPRFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNFFETLHACRAICRA				
HMIQ7c7	---IQGNICSEPKKVGRCRGSFPRFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNFFETLHACRAICRA				
HMIQ7c6	---IQGNICSEPKKVGRCRGSFPRFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNFFETLHACRAICRA				
HCGS1.19	---GSIQLEPKKVGRCRGSFPRFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNFFETLHACRAICRA				
SHPI-1	---SICSEPKKVGRCRGSFPRFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNFFETLHACRAICRA				
HCGS1.44	---GSIQLEPKKVGRCRGSFPRFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNFFETLHACRAICRA				
HCGS1.20	---GSIQLEPKKVGRCRGSFPRFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNFFETLHACRAICRA				
HCGS1.11	---GSIQLEPKKVGRCRGSFPRFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNFFETLHACRAICRA				
HCRG1	---RGICSEPKKVGRCRGSFPRFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNFFETLHACRAICRA				
APHC1	---GSIQLEPKKVGRCRGSFPRFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNFFETLHACRAICRA				
APHC2	---GSIQLEPKKVGRCRGSFPRFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNFFETLHACRAICRA				
APHC3	---GSIQLEPKKVGRCRGSFPRFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNFFETLHACRAICRA				
HCRG21	---RGICSEPKKVGRCRGSFPRFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNFFETLHACRAICRA				
HCGS1.36	---GSIQLEPKKVGRCRGSFPRFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNFFETLHACRAICRA				
AsK2C	---INKDCLLPMDVGRGRARHPRFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNFFETLHACRAICRA				
Tdx1	KDRPDFCLPADTGPCRVRFPSFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNFFETLHACRAICRA				
DTX-B	---RPYACELIVAGPCMFIFSAFYYSKGNKCYFTYSGCGGNGNFFETLHACRAICRA				
DTX-I	QPLRLKCLILHRNPGRGYQKIBAFYNNQKKQCEGFTWSGCGGNSNREKTIIEECRRTCV				
DTX-E	LQHRTFCKLPAEPGPCASIPAFYNNWAAKCKQLFHYGGCKGNANRFSTIEKCRHACVG				
BPTI	---RPDFCLLPYTPGPCKARMIRYFYNAKGLCQPFYVYGGCGGNGNFFETLHACRAICRA				
	*****	*****	*****	*****	
	P1P1'				

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

Рисунок 4 – Выравнивание АП пептидов Кунитц-типа

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 4). Интересно, что в изоформах HClQ6c6 и HClQ6c10 (HMIQ7c3) обнаружена замена His50Arg, а в случае HClQ6c10 еще и замена Gly40Glu, характерные для APHC1–APHC3 и HCRG21 пептидов, модуляторов TRPV1 канала, а также пептида HCGS1.36, которые обладают анальгетической активностью. Замена Gly41Glu вблизи сайта слабых взаимодействий наблюдается в АП HClQ5c2. Замены Lys30Glu, Thr32Lys, Gly40Lys и Gly43Lys в изоформе HClQ6c9 характерны для пептида HCRG1, который ингибирует трипсин и является блокатором K_v каналов. Остатки Arg50 и

Arg51 усиливают положительный заряд в С-концевом фрагменте HMIQ3c1, подобно Lys48 и Lys49 в AsKC2, блокаторе K_v1.2 из *Anemonia viridis*. Примечательно, что пептиды Кунитц-типа змей, такие как Txln 1 из *Pseudonaja textilis*, ингибитор плазмينا, и дендротоксины из *Dendroaspis polylepis*, блокаторы K_v1 каналов, характеризуются наличием отрицательно заряженных остатков в этих позициях (рисунок 4). В изоформах HMIQ7c6 и HMIQ7c7 наблюдаются замены Phe23Ser и Lys10Glu соответственно, а в последовательностях HClQ1c5 и HClQ4c8 обнаружена замена Cys39Arg.

2.1.4 Филогенетический анализ и электростатический потенциал IQ-пептидов

Анализ филогенетического дерева, построенного по методу ближайших соседей (Neighbor-Joining, NJ), показал, что гены IQ- и GS-пептидов имеют общее монофилетическое происхождение. Разделение на кластеры четко коррелирует с полиморфизмом остатка в положении P1 реактивного сайта. Первый кластер включает гены пептидов с Arg в положении P1, тогда как второй кластер объединяет гены, кодирующие пептиды с Lys (HCGS-K) и Thr (HCGS-T) в этом положении (рисунок 5).

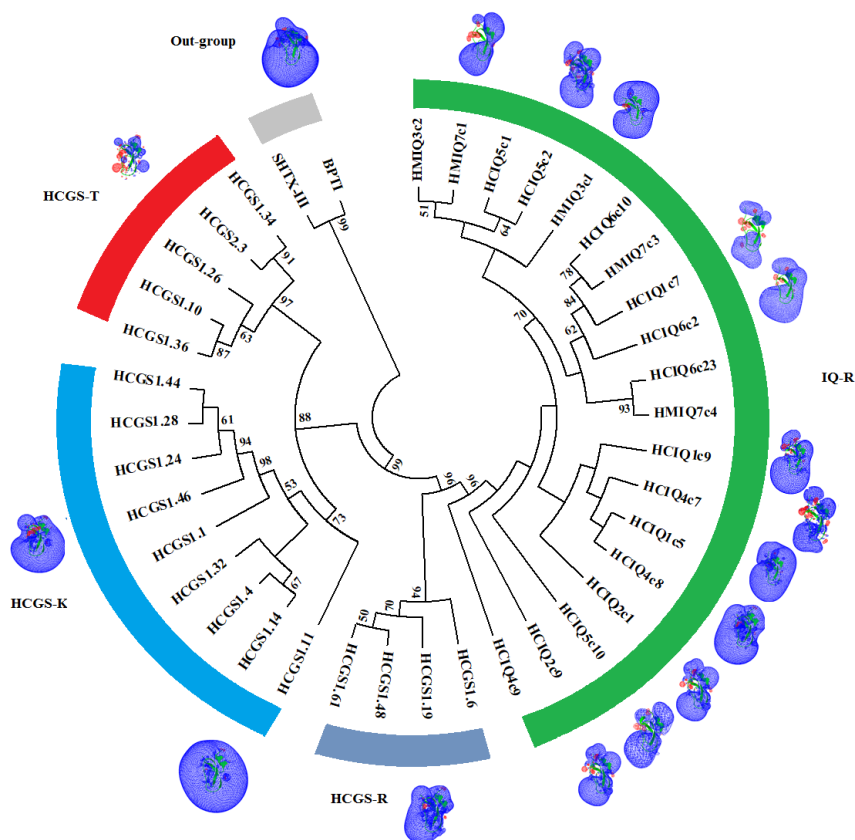


Рисунок 5 – Филогенетическое дерево и эквипотенциальные поверхности IQ- и HCGS-пептидов

Гены IQ-пептидов образуют отдельную группу IQ-R, в основании которой располагается транскрипт *HClQ4c9*. Эти данные подтверждают высказанное предположение о том, что *HClQ4c9* является переходной формой от предкового гена HCGS-пептида, у

которого отсутствует пропептид, к генам HClQ-пептидов. Мы полагаем, что в процессе генной дупликации, рекомбинации и фиксации адаптивных полиморфизмов происходило формирование подсемейства генов IQ-пептидов, которые впоследствии приобрели второй интрон и пропептид-кодирующий участок, что может свидетельствовать о рекруитменте продуктов этих генов в состав яда актиний и возможном приобретении ими новой функции. Существование транскриптов IQ-пептидов в тканях щупалец *H. crista* и *H. magnifica* свидетельствует о появлении подсемейства генов IQ-пептидов до разделения этих видов.

Согласно кластеризации IQ- и GS-пептидов, основанной на их электростатических свойствах, пептиды попадают в те же кластеры, что и при филогенетическом анализе. IQ-пептиды образуют отдельную группу за исключением HClQ4c8, HClQ1c5 и HMIQ3c1, которые попадают в кластер с BPTI, а также HClQ1c9, который находится в кластере HCGS-R. Несмотря на высокую гомологию АП между IQ- и GS-пептидами, их эквипотенциальные поверхности различаются, что может влиять на связывание с протеазами или способствовать взаимодействию с новыми мишенями и модулированию их активности.

Таким образом, сравнение аминокислотных последовательностей IQ- с GS-пептидами позволило выявить основные различия между ними. Монофилетическое происхождение IQ- и HCGS-генов, идентичность первого интрона и наличие переходной формы подтверждают принадлежность генов IQ-пептидов к мультигенному GS-семейству. Существование ортологов IQ-пептидов в *H. crista* и *H. magnifica* свидетельствует о происхождении их генов до видовой дивергенции. Изменение электростатических свойств отдельных IQ-пептидов может влиять на аффинность их связывания с протеазами или способствовать взаимодействию с новыми мишенями, такими как ионные каналы и/или рецепторы.

2.2 Получение и изучение пространственной организации рекомбинантных аналогов IQ-пептидов

2.2.1 Экспрессия и выделение рекомбинантных аналогов IQ-пептидов

Рекомбинантные аналоги IQ-пептидов были получены для HClQ2c1 (наиболее представленная АП) и изоформ с уникальными заменами HClQ1c9 (Gly17Arg), HClQ4c7 (Gly17Glu) и HMIQ3c1 (His50Arg и Ala51Arg). Последовательности генов, кодирующие зрелый пептид, были субклонированы в экспрессионный вектор pET32b(+) по сайтам рестрикции *EcoRI* и *XhoI* под T7-контролируемый промотор. Гетерологичная экспрессия рекомбинантных пептидов в составе гибридного белка с тиоредоксином и полигистидиновой последовательностью была проведена в бактериальной системе *Escherichia coli* штамма BL21 (DE3). После разрушения клеток ультразвуком гибридные белки были выделены с помощью металл-аффинной хроматографии. После обработки бромцианом целевые пептиды были очищены методом ОФ ВЭЖХ (рисунок 6, А). Время удерживания пептидов составило от

27,3 до 35,5 мин. Средний выход пептидов был от 8 до 13 мг на литр клеточной культуры. Согласно результатам МАЛДИ ВП МС, молекулярная масса пептидов составила 6330 Да для HSIQ2c1 (рисунок 6, Б), 6404 Да для HSIQ4c7, 6429 Да для HSIQ1c9 и 6434 Да для HMIQ3c1, что соответствует расчётным данным.

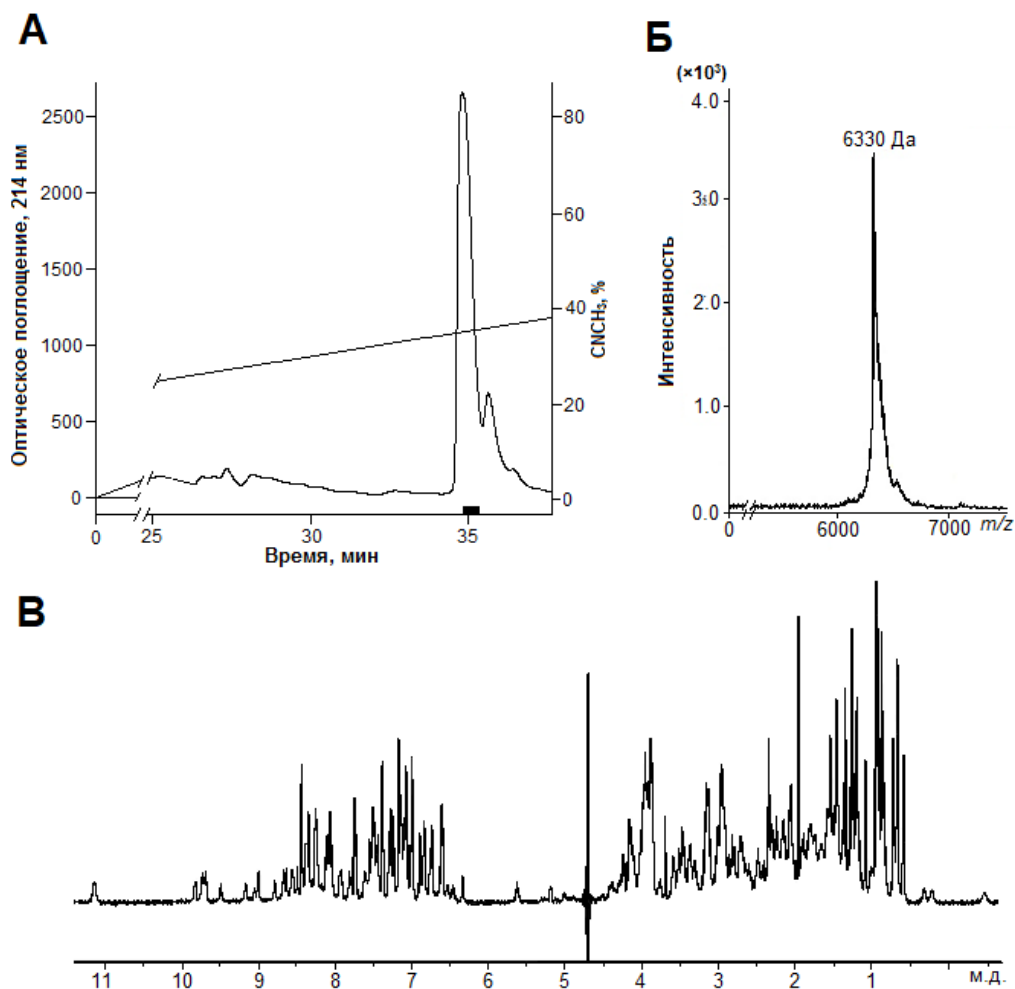
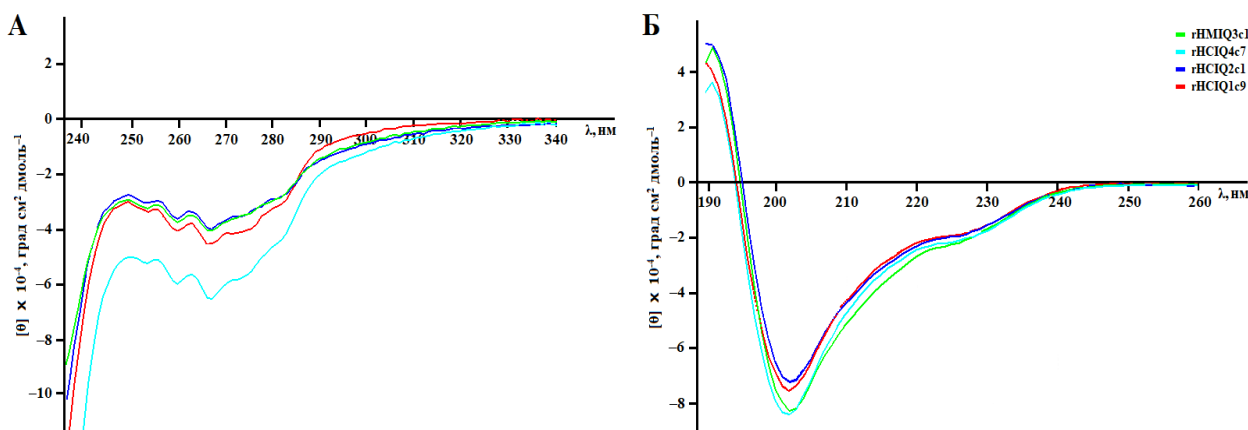


Рисунок 6 – Профиль элюции ОФ ВЭЖХ (А), масс- (Б) и ЯМР- (В) спектры IQ-пептидов на примере рекомбинантного HSIQ2c1

Корректность пространственной укладки IQ-пептидов была подтверждена методом одномерной ^1H ЯМР-спектроскопии (рисунок 6, В). Наличие сигналов в отрицательной области свидетельствует о значительной дисперсии химических сдвигов сигналов NH-протонов, что указывает на формирование пространственной структуры пептидов. Узкие линии сигналов ЯМР-спектра говорят 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 -структуре.

2.2.2 Изучение пространственной организации IQ-пептидов методом КД-спектроскопии

Вторичная структура IQ-пептидов была проанализирована с помощью спектроскопии кругового дихроизма. Спектры КД при 25 °С в ближней УФ-области (240–310 нм) имеют схожую выраженную тонкую структуру с отрицательными полосами при 269 и 260 нм и полосами низкой эллиптичности при 275 и 282 нм, которые относятся к остаткам Phe и Tyr соответственно (рисунок 7, А). Отрицательные полосы при 237 нм, вероятно, соответствуют дисульфидным связям. Тонкая структура КД-спектров указывает на асимметрию окружения ароматических остатков и их жесткую фиксацию в молекулах, что может свидетельствовать о высокой организации пространственной структуры пептидов.



Синей линией показан HSIQ2c1, красной – HSIQ1c9, голубой – HSIQ4c7 и зеленой – HMIQ3c1

Рисунок 7 – Спектры КД IQ-пептидов в деионизированной воде в ближней (А) и дальней (Б) УФ-областях

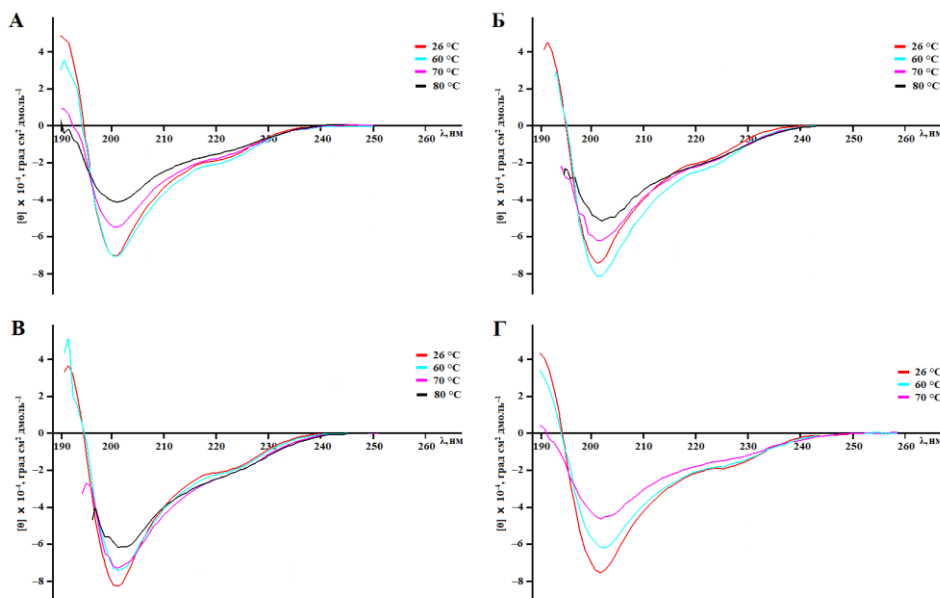
Спектры КД IQ-пептидов в дальней УФ-области (190–240 нм) характеризуются минимумом при 202 нм и максимумом при 193 нм (рисунок 7, Б). IQ-пептиды имеют примерно равное содержание элементов вторичной структуры, за исключением HSIQ1c9, у которого наблюдается увеличение доли α -спиралей и снижение β -структурированных элементов (таблица 1). Подобное распределение указывает на то, что IQ-пептиды относятся к смешанному ($\alpha + \beta$)-типу структурной организации.

Таблица 1 – Содержание элементов вторичной структуры IQ-пептидов и SHPI-1

Пептид	α -Спираль*			β -Структура*			β -Изгиб	Неупорядоченная структура
	I	II	III	I	II	III		
HSIQ2c1	7,1	13,9	21,0	17,4	6,9	24,3	19,0	35,7
HSIQ4c7	7,1	13,9	21,0	17,4	6,9	24,3	18,9	35,5
HSIQ1c9	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.

Согласно спектрам КД, при повышении температуры растворов HSIQ2c1, HMIQ3c1 и HSIQ4c7 с 70 °С до 80 °С наблюдалось снижение эллиптичности отрицательной полосы в области 200 нм и сглаживание плеча в области 225–230 нм, что свидетельствует о конформационном переходе (рисунок 8). Схожее значение температуры конформационного перехода было установлено для InhVJ из *H. crispa*. В случае HSIQ1c9 конформационный переход наблюдался при повышении температуры с 60 °С до 70 °С. При нагревании растворов пептидов выше 80 °С спектры КД изменялись незначительно, поскольку все молекулы уже находились в денатурированном состоянии.



А – HSIQ2c1, Б – HMIQ3c1, В – HSIQ4c7 и Г – HSIQ1c9

Рисунок 8 – 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 °С.

2.3 Изучение биологической активности IQ-пептидов

2.3.1 Определение констант ингибирования трипсина IQ-пептидами

Все рекомбинантные IQ-пептиды ингибировали трипсин. Константы ингибирования (K_i) трипсина были определены по методу Диксона и варьировали в диапазоне концентраций 10^{-8} – 10^{-7} М. Значения K_i трипсина пептидами HSIQ2c1 и HMIQ3c1 оказались близки

значениям констант HCGS- и HCRG-пептидов с Arg и Lys в P1-положении, в то время как значения K_i HClQ4c7 и HClQ1c9 находились в диапазоне значений, соответствующих таковым пептидов с Thr в P1-положении (таблица 2).

Таблица 2 – Константы ингибирования трипсина для пептидов Кунитц-типа актиний

Вид актинии	Пептид	Сайт сильных взаимодействий (положения 11–19)	K_i трипсина, М
<i>H. crispa</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	$3,0 \times 10^{-8}$
<i>H. magnifica</i>	HMIQ3c1	KVGRC R GSF	$5,0 \times 10^{-8}$
<i>H. crispa</i>	APHC1	VVGPC T AYF	$1,0 \times 10^{-6}$
	HCRG21	VVGPC T AYF	$2,0 \times 10^{-7}$
	APHC3	VVGPC T AYF	$5,0 \times 10^{-7}$
	APHC2	VVGPC T AYF	$9,0 \times 10^{-7}$
	InhVJ	VVGPC T AYF	$7,38 \times 10^{-8}$
<i>H. crispa</i>	HCRG1	VVGPC K AGL	$2,8 \times 10^{-8}$
	HCRG2	VVGPC K ARI	$5,0 \times 10^{-8}$
	HCGS1.20	VVGPC K ARI	$2,1 \times 10^{-8}$
<i>S. helianthus</i>	SHPI-1	KVGRC K GYF	$1,1 \times 10^{-10}$

Согласно литературным данным, ингибиторы протеаз Кунитц-типа характеризуются большим положительным зарядом в области протеаза-связывающей петли (положения 11–19), и появление отрицательного заряда в этой области АП может способствовать снижению энергии ассоциации в комплексе пептида с ферментом. Действительно, замена Gly17Glu в HClQ4c7 привела к увеличению K_i на порядок по сравнению с HClQ2c1 (таблица 2). С другой стороны, замена Gly17Arg в HClQ1c9 также способствовала снижению трипсинингибирующей активности пептида. Мы полагаем, что замена нейтрально заряженных остатков Gly или Ala в этом положении на остатки с более объемным заместителем препятствует образованию прочного фермент-ингибиторного комплекса, что приводит к снижению ингибирующей активности.

2.3.2 Исследование взаимодействия IQ-пептидов с сериновыми протеазами

Взаимодействие HClQ2c1, HMIQ3c1 и HClQ4c7 с трипсином, α -химотрипсином, ЭНЧ, калликреином и катепсином G было изучено методом поверхностного плазмонного резонанса на оптическом биосенсоре Biacore 3000. Установлено, что HClQ2c1 образовывал комплексы со всеми исследуемыми протеазами, HMIQ3c1 – с трипсином, α -химотрипсином, калликреином и ЭНЧ, тогда как HClQ4c7 оказался более специфичным пептидом, взаимодействуя только с трипсином и ЭНЧ.

Рассчитанные кинетические параметры комплексообразования указывают на образование достаточно прочных комплексов и исключают неспецифическое связывание (таблица 3). Наиболее прочное связывание наблюдалось для комплексов HClQ2c1 с трипсином и катепсином G. Отсутствие взаимодействия HMIQ3c1 с катепсином G, вероятно, связано с заменами His50Arg и Ala51Arg. Отсутствие взаимодействия HClQ4c7 с α -химотрипсином, калликреином и катепсином G может быть обусловлено заменой Gly17Glu в сайте сильных взаимодействий. Полученные значения K_D комплексов IQ_{im}/трипсин четко коррелируют со значениями K_i трипсина для этих пептидов. Образование комплексов IQ-пептидов с ЭНЧ (все пептиды), калликреином (HClQ2c1 и HMIQ3c1) и катепсином G (HClQ2c1) указывает на высокий потенциал этих пептидов в качестве противовоспалительных соединений.

Таблица 3 – Кинетические параметры образования комплексов IQ-пептидов с сериновыми протеазами

Пептид	Фермент	k_a , 1/М*s	k_d , 1/s	K_A , М ⁻¹	K_D , М
HClQ2c1	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	$1,29 \times 10^6$	$3,59 \times 10^{-4}$	$3,58 \times 10^9$	$2,79 \times 10^{-10}$
HMIQ3c1	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	—	—	—	—
HClQ4c7	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.

Подобно InhVJ, HCRG1 и HCRG2, 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, происходящих при образовании комплексов (таблица 4).

Таблица 4 – Термодинамические параметры образования комплексов пептидов Кунитц-типа с трипсином и/или α -химотрипсином

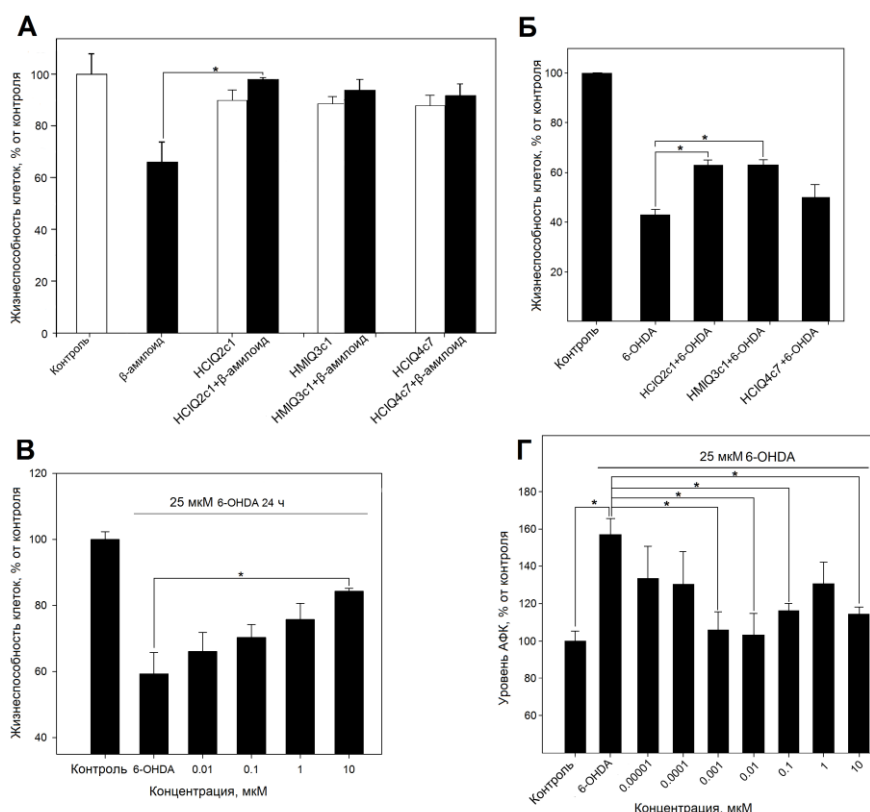
Пептид	Фермент	ΔH , кДж/моль	$T\Delta S$, кДж/моль	ΔG , кДж/моль
НСIQ2c1	Трипсин	72,30	127,04	–54,70
	α -Химотрипсин	19,58	63,27	–43,70
НСRG1	Трипсин	33,00	88,00	–55,00
	α -Химотрипсин	28,00	77,00	–49,00
НСRG2	Трипсин	39,00	92,00	–53,00
	α -Химотрипсин	10,00	60,00	–50,00
InhVJ	Трипсин	44,15	49,35	–5,20
	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, рекомбинантные IQ-пептиды являются ингибиторами трипсина, значения K_i которых находятся в диапазоне значений, характерных для других пептидов Кунитц-типа *H. crista*. Показано, что НСИQ4с7 является более специфичным пептидом, чем НСИQ2с1 и НМИQ3с1, что, вероятно, связано с заменой Gly17Glu в сайте сильных взаимодействий с протеазами. Отсутствие связывания НМИQ3с1 с катепсином G может быть обусловлено заменами His50Arg и/или Ala51Arg. Анализ термодинамических параметров комплексов НСИQ2с1 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 противовоспалительной активности.

2.3.3 Исследование нейропротективной активности IQ-пептидов

Активность НСИQ2с1, НСИQ4с7 и НМИQ3с1 была исследована в *in vitro* моделях β -амилоид- и 6-ОНДА-индуцированной цитотоксичности на клетках нейробластомы мыши Neuro2a. Показано, что пептиды в концентрации 10 мкМ не проявляют токсического действия на клетки (рисунок 9, А). При инкубации клеток нейробластомы с β -амилоидом (25 мкМ) и IQ-пептидами (10 мкМ) наблюдалось увеличение жизнеспособности клеток на $49,2 \pm 1,4\%$, $38,3 \pm 7,1\%$ и $39,4 \pm 6,6\%$ для НСИQ2с1, НСИQ4с7 и НМИQ3с1 соответственно, по сравнению с контролем (рисунок 9, А). Полученные результаты свидетельствуют о нейропротективной активности этих пептидов в отношении токсического действия β -амилоида. Исследование цитопротективного эффекта пептидов на клетки нейробластомы в присутствии 6-ОНДА (25 мкМ) показало, что в концентрации 10 мкМ НСИQ4с7 и НСИQ2с1 увеличивали жизнеспособность клеток на $14 \pm 4,4\%$ и $47 \pm 4,8\%$ соответственно, по сравнению с контролем, при этом НМИQ3с1 не оказывал какого-либо положительного

эффекта на клетки нейробластомы (рисунок. 9, Б). Достоверный дозо-зависимый эффект установлен для HSIQ2c1; максимальный эффект достигался при концентрации пептида 10 мкМ (рисунок 9, В). Показано, что совместная обработка клеток 6-OHDA (25 мкМ) и HSIQ2c1 (0,001–0,01 мкМ) приводит к снижению образования АФК. Максимальный эффект ($34 \pm 5,2\%$) наблюдался при концентрации 0,01 мкМ (рисунок 9, Г).



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 HSIQ2c1 на жизнеспособность клеток Neuro2a в присутствии 6-OHDA. Г – Концентрационная зависимость влияния HSIQ2c1 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 $\pm$ стандартное отклонение ($n=3$), $*p<0.05$

Рисунок 9 – Влияние IQ-пептидов на жизнеспособность клеток нейробластомы Neuro2a в присутствии β-амилоида и 6-OHDA

Известно, что K_v 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. Для подтверждения возможного механизма цитопротективной активности 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*. Установлено, что ни один пептид не влияет на активность K_v1

каналов. Эти результаты свидетельствуют о наличии иного механизма нейропротективной активности IQ-пептидов, отличного от вовлечения K_v1 каналов.

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

3 Материалы и методы

Образцы актиний *H. crista* и *H. magnifica* были собраны в заливе Нячанг (Южно-Китайское море, Вьетнам). Выделение нуклеиновых кислот, идентификацию генов и транскриптов IQ-пептидов, получение рекомбинантных плазмид осуществляли классическими и современными (NGS ампликонов) методами молекулярной биологии. Анализ последовательностей проводили в программах GS Amplicon Variant Analyzer, Vector NTI 10, MEGA 6, Modeller 9.11 и Chimera 1.9. Рекомбинантные IQ-пептиды получали путем гетерологичной экспрессии в бактериальной системе *E. coli*. Выделение пептидов проводили с помощью металл-аффинной хроматографии и ОФ ВЭЖХ. Молекулярные массы пептидов определяли на МАЛДИ ВП МС. Пространственную структуру пептидов оценивали с помощью 1H ЯМР- и КД-спектроскопии. Взаимодействие рекомбинантных IQ-пептидов с сериновыми протеазами изучали методом поверхностного плазмонного резонанса на оптическом биосенсоре. Исследование цитопротективной активности пептидов осуществляли в *in vitro* моделях β -амилоид- и 6-OHDA-индуцированной токсичности. Влияние IQ-пептидов на K_v1 каналы изучали методом электрофизиологического тестирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ядовитом секрете актиний рода *Heteractis* пептиды Кунитц-типа представлены в виде комбинаторной библиотеки, образованной четырьмя группами высокомолекулярных 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, различающиеся 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, свойственным нейротоксинам и актинопоринам 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, которое 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 K_v1 каналов, что предполагает 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*, обнаруженное в данном исследовании, взаимодействие отдельных представителей с различными сериновыми протеазами, а также проявление ими нейропротективной активности создает предпосылки к продолжению исследований этих пептидов, представляющих 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 НСІQ2c1 и НМІQ3c1 взаимодействуют с трипсином, α -химотрипсином, калликреином, эластазой нейтрофилов человека и катепсином G (только НСІQ2c1), тогда как НСІQ4c7 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 НСІQ2c1 с трипсином и α -химотрипсином существенный вклад вносит энтропийный фактор.
7. Показано, что НСІQ2c1 и НСІQ4c7 ингибируют цитотоксическое действие β -амилоида и 6-гидроксидофамина на клетки нейробластомы мыши, тогда как НМІQ3c1 проявляет защитный эффект только в отношении β -амилоида. Цитопротективный эффект НСІQ2c1 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 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 морской анемоны *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., Pisyagin E., Yurchenko E., Menchinskaya E., Aminin D., Kaluzhskiy L., Ivanov A., Peigneur S., Tytgat J., Kozlovskaya E.P., Isaeva M.P. A new multigene HClQ 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

1. 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.
2. 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.
3. Kvetkina A.N., Yurchenko E.A., Leychenko E.V., Isaeva M. P., Aminin D.L., Kozlovskaya E.P. The protective effect of *Heteractis crispa* HClQ-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.
4. 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: абстр. С. 54.
5. 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: Тезисы докладов, с. 16.
6. 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.
7. 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.
8. 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 сент. 2020: Тезисы докладов, с. 16.