

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

На правах рукописи

Синцова Оксана Владимировна

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

03.01.04 – Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.х.н. Монастырская Маргарита Михайловна

Владивосток – 2018

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.

Оглавление

Оглавление	3
Список сокращений и условных обозначений	5
Введение.....	7
1 Обзор литературы.....	11
1.1 Яд актиний содержит множество биологически активных пептидов.....	11
1.2 Пептиды Кунитц-типа – распространенные компоненты яда животных	13
1.3 Протеиназы – мишень пептидов Кунитц-типа большинства животных	16
1.4 Пептиды Кунитц-типа контролируют активность протеиназ.....	18
1.5 Ионные каналы – мишень токсинов Кунитц-типа ядовитых животных	21
1.5.1 Структура и функции K_v	22
1.5.2 Пептиды Кунитц-типа – блокаторы $K_v1.x$	24
1.5.3 Ионотропный рецептор TRPV1, структура и функции	27
1.5.4 Пептиды Кунитц-типа – антагонисты TRPV1	29
1.6 Пептиды Кунитц-типа актинии <i>Heteractis crispa</i>	32
2 Материалы и методы.....	35
2.1 Материалы и оборудование.....	35
2.1.1 Материалы.....	35
2.1.2 Оборудование.....	36
2.1.3 Биологический материал	36
2.2 Методы	37
2.2.2 Протеомный анализ яда актинии <i>Heteractis magnifica</i>	37
2.2.3 Установление аминокислотной последовательности пептидов	39
2.2.4 Установление последовательностей транскриптов.....	40
2.2.5 Получение рекомбинантных пептидов.....	41

2.2.6 Установление биологической активности индивидуальных пептидов.....	46
3 Результаты исследования и их обсуждение.....	50
3.1 Протеомный анализ ядовитого секрета актинии <i>H. magnifica</i>	50
3.1.1 Получение нейротоксической фракции ядовитого секрета	50
3.1.2 Конструирование пептидных карт	52
3.1.3 Установление аминокислотных последовательностей пептидов	56
3.1.4 Установление последовательностей транскриптов, кодирующих пептиды Кунитц- типа актинии <i>H. magnifica</i>	57
3.2 Выделение новых пептидов Кунитц-типа из актинии <i>H. crispa</i>	60
3.3 Филогенетический анализ пептидов Кунитц-типа актиний <i>H. crispa</i> и <i>H. magnifica</i>	62
3.4 Получение рекомбинантных пептидов Кунитц-типа.....	65
3.5 Исследование биологической активности нативных и рекомбинантных пептидов.....	71
3.5.1 Определение трипсинингибирующей активности пептидов	71
3.5.2 Анализ острой токсичности пептидов.....	72
3.5.3 Электрофизиологический анализ пептидов	72
3.5.3.1 Пептиды HCRG1 и HCRG2 – блокаторы K _v 1.1, K _v 1.2, K _v 1.3, K _v 1.6 и Shaker IR	73
3.5.3.2 Пептид HCRG21 – полный антагонист TRPV1	77
3.5.4 Противовоспалительная активность пептидов в моделях <i>in vitro</i>	79
3.5.4.1 Влияние пептидов на продукцию провоспалительных медиаторов	79
3.5.4.2 Влияние пептидов на развитие окислительного стресса	81
3.5.4.3 Антигистаминная активность пептидов	82
Заключение	84
Выводы	86
Список литературы.	87

Список сокращений и условных обозначений

- А.о. – аминокислотный остаток;
- АП – аминокислотная последовательность;
- АФК – активные формы кислорода;
- БПТИ (ВРТИ, апротинин) – бычий панкреатический ингибитор трипсина;
- ИЛ – интерлейкин;
- ИПТГ – изопропил- β -D-тиогалактозид;
- ЛПС – липополисахарид бактерий;
- МС – масс-спектрометрия;
- НП – нуклеотидная последовательность;
- н.п. – пары нуклеотидов;
- об/мин – оборотов в минуту;
- ОФ ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография;
- ПЦР – полимеразная цепная реакция;
- ФНО- α – фактор некроза опухоли- α ;
- Трис – трис-(гидроксиметил)-аминометан;
- ТФУ – трифторуксусная кислота;
- ФСБР – фосфатно-солевой буферный раствор;
- ВАРНА – *N*-бензоил-*D,L*-аргинин *n*-нитроанилид;
- BrCN – бромистый цианоген;
- dNTPs – дезоксинуклеозидтрифосфаты;
- DCFH-DA – АФК-чувствительный флуоресцентный зонд;
- $[Ca^{2+}]_i$ – внутриклеточная концентрация ионов кальция;
- Ca_v – потенциал-зависимый кальциевый канал;
- EC₅₀ – полумаксимальная эффективная концентрация;
- FA-OMe – NO-чувствительный флуоресцентный зонд;
- Fluo-3/AM – кальций-чувствительный флуоресцентный зонд;
- НРА – человеческая панкреатическая α -амилаза;
- iNOS – индуцируемая NO-синтаза;
- IC₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования;
- K_d – константа диссоциации;
- K_i – константа ингибирования;
- K_v – потенциал-зависимый калиевый канал;

MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)

– времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией;

Na_v – потенциал-зависимый натриевый канал;

NO – оксид азота (II);

P1 – ключевой остаток реактивного центра ингибитора Кунитц-типа;

PARs – рецепторы, активируемые протеиназами;

PDB (Protein Data Bank) – база данных пространственных структур пептидов;

PDB ID – уникальный шифр доступа пространственной структуры каждого белка в базе данных PDB;

PPA – свиная панкреатическая α-амилаза;

S1 – ключевой остаток активного центра сериновой протеиназы;

SHTXIII – токсин Кунитц-типа актинии *Stichodactyla haddoni*, блокирующий K_v;

TRPA1 (Transient Receptor Potential Ankyrin 1) – анкириновый рецептор 1;

TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1) – ваниллоидный рецептор 1;

Trx – тиоредоксин;

AVPR2 (arginine vasopressin receptor 2) – рецептор вазопрессина типа 2;

UniProt – база данных последовательностей белков и пептидов.

В описании под выравниваниями аминокислотных последовательностей, в круглых скобках после названия пептида, указан его номер в базе данных UniProt, например, BPTI (P00974).

Введение

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 кишечнорастных, 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 кишечнорастворимых.

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 наряду с нейро- и пороформирующими токсинами, ингибиторы протеиназ Кунитц-типа являются главным компонентом ядовитого секрета. Впервые установлены основные изоформы пептидов Кунитц-типа актинии *H. magnifica*, две из которых оказались идентичны пептидам из актинии *H. crispa*.

Из водного экстракта актинии *H. crista* 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 позволяют более корректно идентифицировать пептиды 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 и ионотропного рецептора TRPV1. Биологически активные пептиды Кунитц-типа актиний семейства Stichodactylidae перспективны в качестве прототипов новых 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. crista*.
3. Пептиды Кунитц-типа *H. crista*, 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.

1 Обзор литературы

1.1 Яд актиний содержит множество биологически активных пептидов

Актинии (тип Стрекающие) являются наиболее древними ядовитыми хищниками (~800 миллионов лет), они ведут сидячий образ жизни и обитают исключительно в водной среде (Norton and Chandy, 2017). Отличительной особенностью всех стрекающих является наличие специализированных жалящих клеток (книдоцитов), содержащих ядовитый секрет (Antonini et al., 2014; Chi et al., 2012; Frazão et al., 2012; Jouiaei et al., 2015; Leichenko et al., 2014; Tirosh et al., 2012). Наибольшее количество книдоцитов локализовано на щупальцах, но некоторые находятся также на теле животного (Рисунок 1) (Fautin, 2009). Ввиду отсутствия централизованной ядовитой железы исследователи обычно собирают ядовитый секрет вместе со слизью, обволакивающей актинию и служащей барьером, обеспечивающим взаимодействие с окружающей средой и защиту от хищников и патогенов (Minagawa et al., 2008; Stabili et al., 2015; Zaharenko et al., 2008).

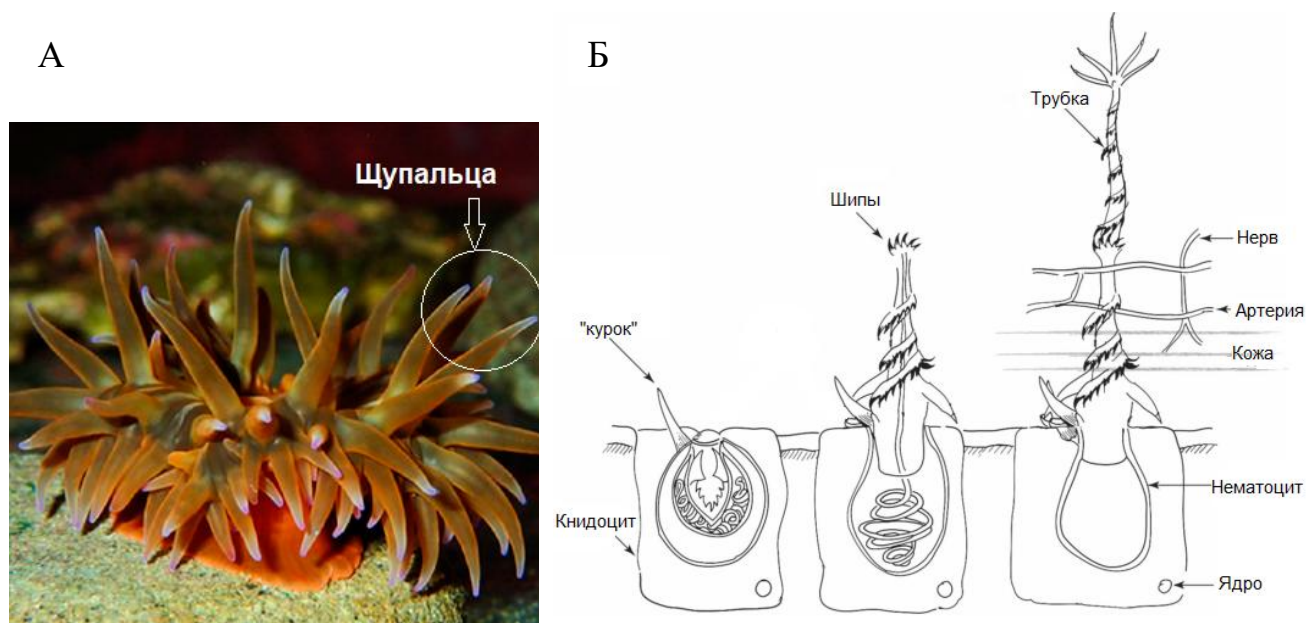


Рисунок 1 – (А) Внешний вид актинии *Actinia australiensis* (Prentis et al., 2018). (Б) Схематическое изображение структуры книдоцита и процесса его выстреливания в тело жертвы (Montgomery et al., 2016).

Начиная с 1970-х годов поиск биологически активных пептидов, продуцируемых актиниями, включал разделение компонентов яда комбинацией методов жидкостной хроматографии и тестирование биологической активности фракций (Andreev et al., 2012,

2008; Castañeda et al., 1995; Delfin et al., 1996; Eid et al., 2008; Gendeh et al., 1997; Gladkikh et al., 2012; Honma et al., 2008; Kem et al., 1989; Khoo et al., 1993; Monastyrnaya et al., 2010; Samejima et al., 2000; Schweitz et al., 1995, 1985; Shiomi et al., 2003; Valcarcel et al., 2001; Yamaguchi et al., 2010; Zykova et al., 1985; Zykova and Kozlovskaja, 1989). В яде актиний были обнаружены разнообразные биологически активные пептиды: токсины – блокаторы и модуляторы ионных каналов (Cassoli et al., 2013; Castañeda et al., 1995; Gendeh et al., 1997; Kem et al., 1989; Kozlov et al., 2012; Schweitz et al., 1985; Shiomi et al., 2003; Yamaguchi et al., 2010; Zykova and Kozlovskaja, 1989), фосфолипаза A₂ (Mariottini and Pane, 2013), α -пороформирующие токсины (Khoo et al., 1993; Leichenko et al., 2014; Monastyrnaya et al., 2010; Samejima et al., 2000; Valcarcel et al., 2001; Wang et al., 2008, 2000), ингибиторы протеиназ (Andreev et al., 2008; Delfin et al., 1996; Gladkikh et al., 2012; Honma et al., 2008) и ингибитор панкреатической α -амилазы (Tysoe et al., 2016). В настоящее время появляется все больше работ, посвященных изучению разнообразия пептидов актиний методами протеомики, транскриптомики и геномики. Первый протеомный анализ, проведенный для актинии *Bunodosoma cangicum*, позволил детектировать молекулярную массу 81 пептида, а также выделить и охарактеризовать 9 новых пептидов (Zaharenko et al., 2008). В результате протеомного анализа яда актиний *Stichodactyla helianthus* и *Bunodosoma granulifera* было обнаружено 156 пептидов, а по итогу транскриптомного анализа были выведены последовательности пяти новых APETx-подобных токсинов (Rodríguez et al., 2012). Протеомным анализом яда актинии *Stichodactyla duerdeni* было идентифицировано 134 пептида (с молекулярной массой от 901 до 10833 Да), включая гликопептид U-SHTX-Sdd1 (Cassoli et al., 2013). На основе кДНК актинии *H. crispa* были получены последовательности транскриптов мультигенного суперсемейства, кодирующие пептиды Кунитц-типа (Isaeva et al., 2012). Транскриптомный анализ трех видов актиний (*Anemonia sulcata*, *H. crispa* и *Megalactis griffithsi*) позволил изучить разнообразие транскриптов различных токсинов и определить части тела, в которых происходит их синтез (Macrander et al., 2016). Анализ генома *Nematostella vectensis* показал, что репертуар генов актинии является удивительно сложным, и множество генов ортологично генам человека (Putnam et al., 2007). Позже эти данные были успешно использованы для поиска и анализа генов *N. vectensis*, кодирующих токсины потенциал-зависимых натриевых каналов (Na_v) (Moran et al., 2008a, 2008b). Современные подходы облегчают изучение пептидного разнообразия и способствуют более быстрому обнаружению новых биологически активных пептидов актиний, ядовитый секрет которых, в отличие от хорошо изученного яда змей и пауков, малодоступен и содержится в незначительных количествах.

1.2 Пептиды Кунитц-типа – распространенные компоненты яда животных

Одной из основных групп биологически активных пептидов, продуцируемых актиниями, являются ингибиторы протеиназ, относящиеся к структурному семейству Кунитца. Наиболее исследованный представитель данного семейства – бычий панкреатический ингибитор трипсина (БПТИ) или апротинин, был выделен и охарактеризован лауреатами Нобелевской премии Д. Нортропом и М. Кунитцем в 1936 году (Kunitz and Northrop, 1936). Молекулярная масса БПТИ равна 6518 Да, его аминокислотная последовательность (58 а.о.) стабилизирована тремя дисульфидными связями, что обеспечивает формирование компактной и чрезвычайно стабильной третичной структуры (Рисунок 2 А). Известно, что топология расположения дисульфидных связей ($\text{Cys}^{\text{I}}\text{--Cys}^{\text{VI}}$, $\text{Cys}^{\text{II}}\text{--Cys}^{\text{IV}}$, $\text{Cys}^{\text{III}}\text{--Cys}^{\text{V}}$) и реактивного центра одинакова у всех представителей этого семейства и является его характерной особенностью (Рисунок 2 Б). Однако в организмах скорпионов и конусов были обнаружены пептиды Кунитц-типа с неканоническим расположением дисульфидных связей (Bayrhuber et al., 2005; Chen et al., 2013).

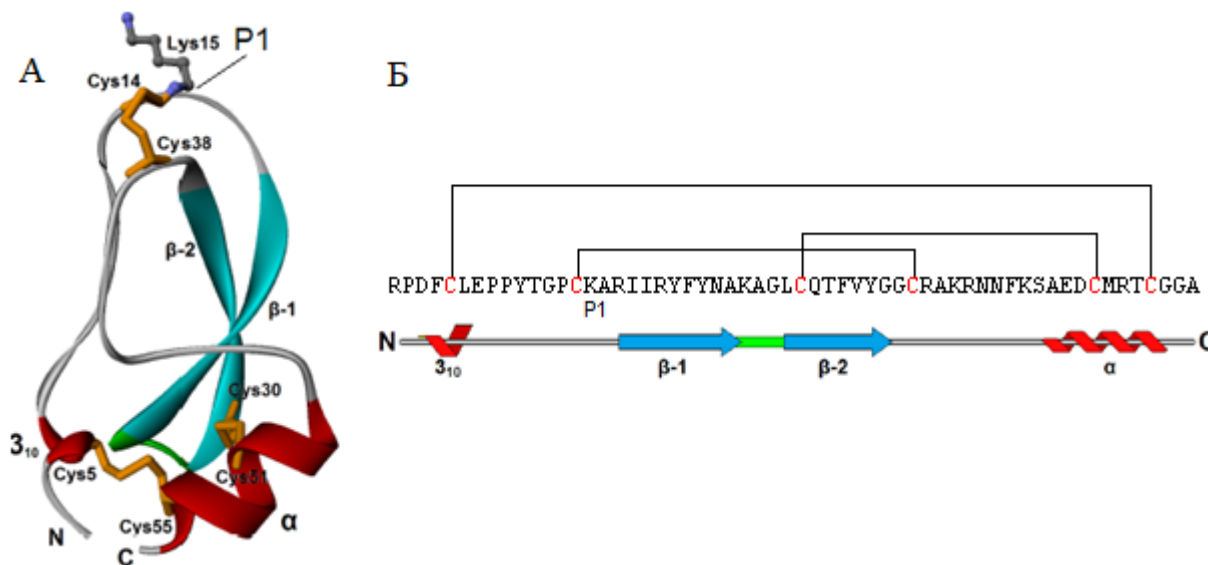


Рисунок 2 – (А) Модель 3D-структуры БПТИ (PDB ID 2PTC (Marquart et al., 1983)) в виде ленточной диаграммы. Указаны N- и С-концы, стренды $\beta 1$ и $\beta 2$, 3_{10} -спираль, α -спираль, остаток в P1 положении (Lys15). Визуализация выполнена с помощью программы DS Visualizer к.х.н. Табакмахером В.М. (Табакмахер, 2014). (Б) Аминокислотная последовательность БПТИ (UniProt AN P00974) и схема расположения элементов вторичной структуры. Топология расположения дисульфидных связей показана черными линиями.

Полипептидные токсины, входящие в состав ядов животных, эволюционируют по общим законам, в основном путем дупликации с последующей неофункционализацией генов, кодирующих белки, участвующие в выполнении физиологических функций. Действие очистительного отбора на новые копии генов ослабляется, поэтому они чаще претерпевают мутации, вследствие которых приобретают новые функции (неофункционализация) и

становятся токсинами (Nei et al., 1997). Экспрессия образовавшихся токсинов происходит избирательно в клетках ядовитых желез, в то время как предковый пептид продолжает функционировать в различных органах (Kordiř and Gubenřek, 2000). Было установлено, что токсинами становятся преимущественно небольшие белки, стабилизированные несколькими дисульфидными связями. При этом гены токсинов претерпевают множественные дупликации и формируют мультигенные семейства, продукты экспрессии которых могут взаимодействовать как с одной мишенью, но с разной эффективностью, так и действовать на различные мишени (Chang and Duda, 2012; Fry, 2005; Fry et al., 2003; Kordiř and Gubenřek, 2000; Nei et al., 1997; Weinberger et al., 2010).

Многочисленные исследования показали, что гены токсинов подвергаются действию положительного отбора, который направлен на аминокислотные остатки, экспонированные на поверхности молекулы и не принимающие участия в поддержании третичной структуры, характерной для определенного структурного семейства белков (фолда) (Casewell et al., 2011; Juárez et al., 2008; Zhu et al., 2011). Именно эти остатки отвечают за неофункционализацию токсина, изменение его эффективности и специфичности. Большие мультигенные семейства токсинов обеспечивают ядовитым хищникам преимущество для охоты и выживания. Установлено, что во многих случаях в их яде происходит сохранение и экспрессия паралогичных генов, особенно, если компоненты яда обладают синергетическим действием или нацелены на множество жертв (Casewell et al., 2013).

Несмотря на комплексность ядов животных различных систематических групп, эволюция токсинов конвергентна относительно мишеней их действия и используемых предковых генов. Яды практически всех животных ориентированы на взаимодействие с компонентами сигнальных путей, клетками и тканями, доступными для кровяного русла, а именно нервной системы (ионные каналы и рецепторы) и системы гемостаза (протеиназы). Однако более интересным проявлением конвергентной эволюции является тот факт, что из всего разнообразия белковых фолдов только некоторые из них стали токсинами.

Установлено, что представители четырнадцати структурных семейств белков, в частности пептиды Кунитц-типа, присутствуют в составе ядов животных двух и более систематических групп (Рисунок 3) (Casewell et al., 2013; Fry et al., 2009). В литературе описаны пептиды Кунитц-типа, найденные в ядовитом секрете актиний (Delfin et al., 1996; Gladkikh et al., 2012; Honma et al., 2008), брюхоногих моллюсков (конусы) (Bayrhuber et al., 2005), пчел (Choo et al., 2012), ос (Hisada et al., 2005), мух (Tsujimoto et al., 2012), скорпионов (Chen et al., 2012), пауков (Wan et al., 2013; Yuan et al., 2008), клещей (Paesen et al., 2007), лягушек (Wang et al., 2012) и змей (Harvey, 2001; Owen et al., 1997).

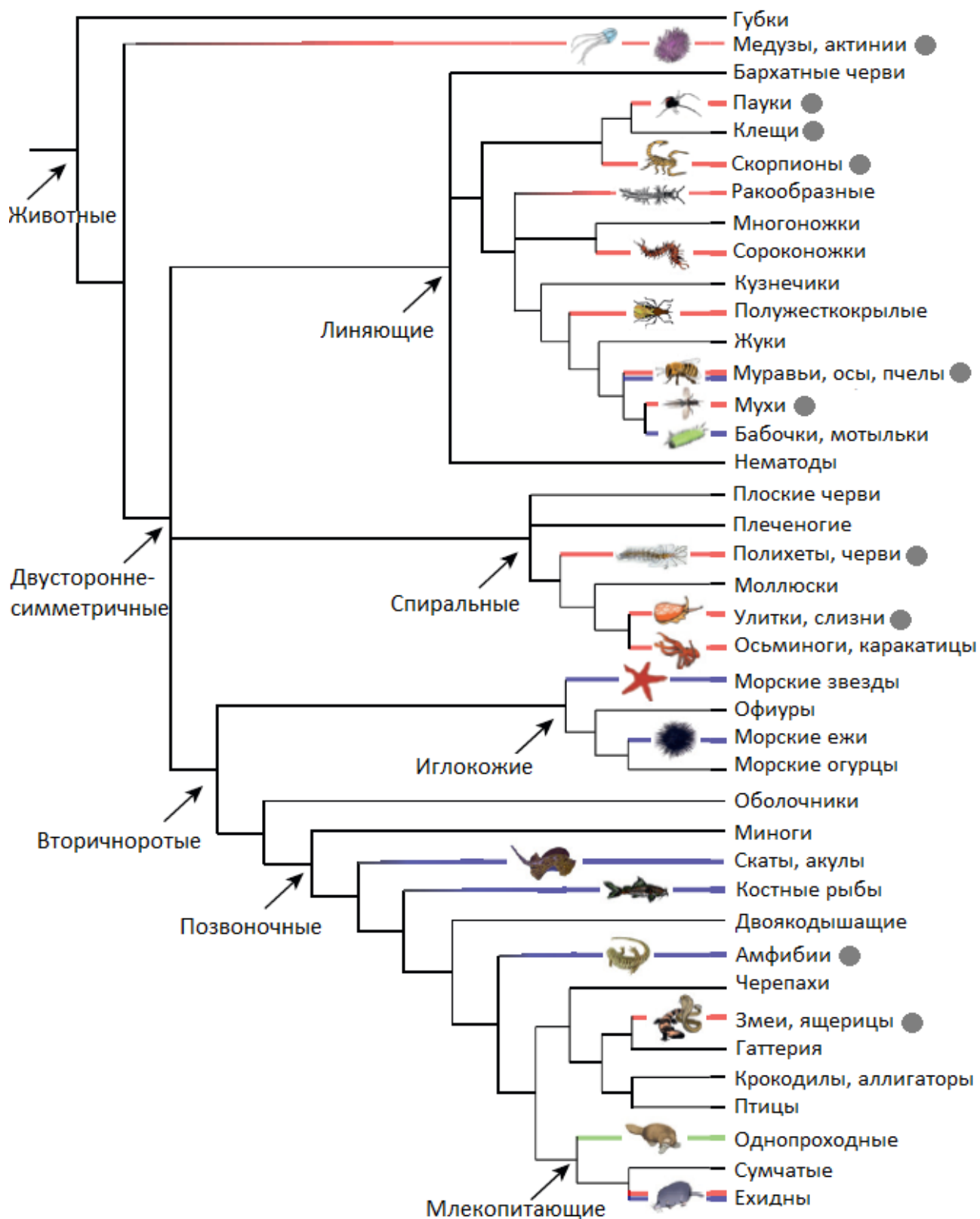


Рисунок 3 – Филогенетическое дерево царства животных, на котором показаны ядовитые представители. Цветные ветви демонстрируют ядовитых животных. Красным отмечены животные, использующие яд для хищничества, голубым – защиты, зеленым – внутривидовой борьбы (Casewell et al., 2013). Серыми кругами отмечены животные, в яде которых присутствуют пептиды Кунитц-типа.

Мультигенные семейства пептидов Кунитц-типа насчитывают десятки представителей, обладающих как предковой функцией, так и приобретших новые. Неофункционализация пептидов Кунитц-типа была направлена на взаимодействие с основными составляющими сигнальных путей организма – протеиназами, ионными каналами и рецепторами (Dai et al., 2012; Fry et al., 2009; Isaeva et al., 2012; Jiang et al., 2014; Yuan et al., 2008; Župunski et al., 2003).

Ингибирование активности разнообразных протеиназ, циркулирующих в крови жертвы (протеиназы каскада коагуляции, системы комплемента, тучных клеток и нейтрофилов), пептидами Кунитц-типа ядовитых животных позволяет эффективно регулировать многочисленные биохимические процессы, а также препятствовать биодеградации токсинов, тем самым усиливая и пролонгируя их эффект (Ma et al., 2016). Пептиды Кунитц-типа, способные модулировать работу ионных каналов или рецепторов, воздействуют на нервную систему жертвы, снижают чувствительность к боли, вызывают паралич и судороги (Báez et al., 2015; Chaki et al., 1992; Ciolek et al., 2017; Nikolaev et al., 2017; Peigneur et al., 2011; Stotz et al., 2000; Wang et al., 2012).

Высокая стабильность в сочетании со способностью взаимодействовать со звеньями патогенеза многих заболеваний делает пептиды Кунитц-типа ядовитых животных привлекательным объектом фармакологических исследований. Ниже рассмотрены основные мишени пептидов Кунитц-типа актиний, а именно протеолитические ферменты, потенциал-зависимые калиевые каналы и ионотропный рецептор TRPV1, их структура и участие в процессах жизнедеятельности организма. Приведены примеры пептидов Кунитц-типа различных животных, взаимодействующих с данными мишенями.

1.3 Протеиназы – мишень пептидов Кунитц-типа большинства животных

Протеолитические ферменты и их ингибиторы кодируются более чем 2% генома человека (Puente et al., 2005). Протеиназы являются глобулярными белками, размер которых варьирует от относительно небольших молекул (катепсины, ~20 кДа) до мультидоменных комплексов (протеасома 26S, ~2000 кДа). Их подразделяют на пять основных классов, именуемых согласно ключевому аминокислотному остатку (или иону металла), вовлеченному в расщепление пептидной связи. Эти классы включают сериновые, треониновые, цистеиновые, аспарагиновые и металлопротеиназы (см. MEROPs database (<https://www.ebi.ac.uk/merops/>)). Сериновые, цистеиновые и металлопротеиназы многочисленны и насчитывают более 100 представителей в каждом классе, в то время как

классы треониновых и аспарагиновых протеиназ ограничиваются менее чем 30 представителями (López-Otín and Bond, 2008).

Семейство S1 сериновых протеиназ клана PA (классификация MEROPs) – самое большое и функционально гетерогенное (Rawlings et al., 2004). Механизм ферментативного катализа сериновыми протеиназами был подробно исследован с помощью рентгеноструктурного анализа комплексов пептида Кунитц-типа, БПТИ, с трипсином и α -химотрипсином (Blow and Smith, 1975; Marquart et al., 1983). Гидролиз пептидной связи субстрата осуществляется каталитической триадой, образованной боковыми цепями аминокислотных остатков Ser195, His57 и Asp102 (Рисунок 4). Несмотря на структурное сходство, для представителей семейства S1 характерно наличие активности по отношению к субстратам с различными аминокислотными остатками в P1 положении аминокислотной последовательности субстрата, так, трипсин расщепляет пептидную связь, образованную положительно заряженными остатками Arg и Lys, химотрипсин – гидрофобными остатками Phe, Tgr и Tug, эластаза – нейтральными остатками Ala и Gly (Di Cera, 2009; Page and Di Cera, 2008).

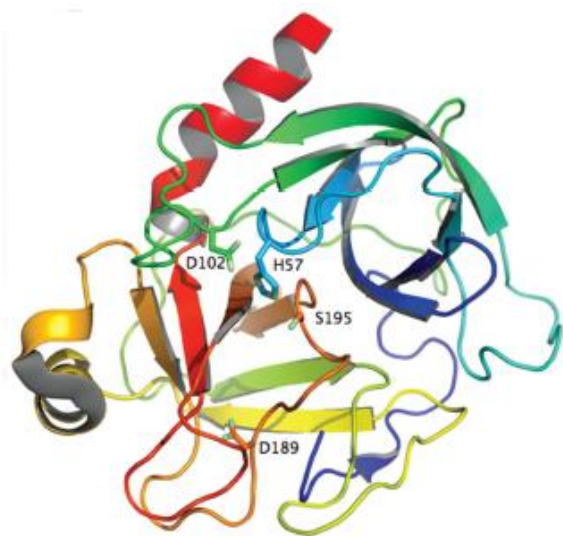


Рисунок 4 – Пространственная организация трипсина (PDB ID 2PTN (Fehlhammer and Bode, 1975)), представителя сериновых протеиназ семейства S1 клана PA, в виде ленточной диаграммы. N-конец окрашен в фиолетовый, C-конец в красный цвет. Боковые цепи остатков каталитической триады показаны цветами: Asp102 – зеленым, His57 – голубым, Ser 195 – оранжевым. Остаток Asp189 занимает нижнюю часть каталитического кармана и проявляет специфичность по отношению к боковой цепи остатков Arg или Lys субстрата (Di Cera, 2009).

Наряду с участием в пищеварении, протеиназы регулируют множество процессов, запуская как нерцепторные, так и рцепторно-опосредованные сигнальные пути, и являются, таким образом, гормоноподобными медиаторами. Передача сигнала, вызванная расщеплением разнообразных мишеней, играет важную роль в патогенезе воспалительных заболеваний (аутоиммунные, нейродегенеративные, онкологические). Мишенями протеиназ являются рцепторы клеточной мембраны, в том числе рцепторы активируемые протеиназами (PARs), рцепторы инсулина, факторов роста, интегринов и белков адгезии (ADGRs), а также ионные каналы и предшественники воспалительных пептидов (Ramachandran et al., 2016). Неограниченный протеолиз губителен для биологических систем, поэтому протеиназы находятся под строгим контролем, который гарантирует их действие

только в соответствующем биологическом контексте и в сильно ограниченной степени. Данная проблема имеет особое значение в условиях воспаления, когда наблюдается обширный протеолиз. В ходе эволюции были развиты механизмы регуляции активности протеиназ, так регуляция на транскрипционном уровне приводит к избирательной экспрессии генов в тех или иных тканях, а синтез в форме неактивных зимогенов требует ограниченного локального протеолиза для высвобождения зрелого активного фермента. В дополнение к этим регуляторным механизмам активность зрелых протеиназ контролируется эндогенными специфическими ингибиторами, которые также важны для регуляции передачи сигналов, как и сами протеиназы (Rawlings et al., 2004).

Необходимо отметить, что по сравнению с большим количеством протеиназ в организме человека разнообразие их эндогенных ингибиторов является ограниченным. Для большого семейства матричных металлопротеиназ идентифицировано только четыре эндогенных ингибитора. Аналогично количество цистеиновых протеиназ превышает количество их эндогенных ингибиторов. Удивительно, но эндогенные ингибиторы сериновой протеиназы β -триптазы и аспарагиновых протеиназ не известны. Однако высокоактивные ингибиторы триптазы были найдены в секрете слюнных желез животных, питающихся кровью, а именно клеща и пиявки (Paesen et al., 2007; Sommerhoff et al., 1994). Наибольшее количество эндогенных ингибиторов описано для сериновых протеиназ, их называют серпинами (SERPINs) (Ramachandran et al., 2016).

Регуляция экспрессии ингибиторов протеиназ играет важную физиологическую роль во многих процессах, а ее нарушение обуславливает развитие некоторых заболеваний. Например, дефицит ингибитора сериновых протеиназ семейства Казала (SPINK5) приводит к развитию аллергии и воспалению кожных покровов (Hovnanian, 2013). Усиление синтеза или введение ингибитора эластазы лейкоцитов (Serpina3N) в спинномозговой ганглий уменьшает нейропатическую боль, возникающую в результате повреждения нерва (Viciña et al., 2015).

1.4 Пептиды Кунитц-типа контролируют активность протеиназ

Как упоминалось выше, кристаллическая структура БПТИ и его комплексов является удобной моделью для изучения белок-белковых взаимодействий. Установлено, что ингибиторы Кунитц-типа взаимодействуют с сериновыми протеиназами по субстратоподобному механизму и образуют устойчивые комплексы в стехиометрическом соотношении 1:1 (Рисунок 5 А). Фрагменты молекулы ингибитора, соответствующие аминокислотным остаткам 11–19 (реактивный сайт/сайт сильных взаимодействий) и 34–39

(сайт слабых взаимодействий) (нумерация в молекуле БПТИ), участвуют в связывании с протеиназами. Установлено, что БПТИ ингибирует трипсин, α -химотрипсин, плазмин, калликреин, тромбин, катепсин G, акрозин и урокиназный активатор плазминогена (Ascenzi et al., 2003; Buczek et al., 2002; Sun et al., 2009).

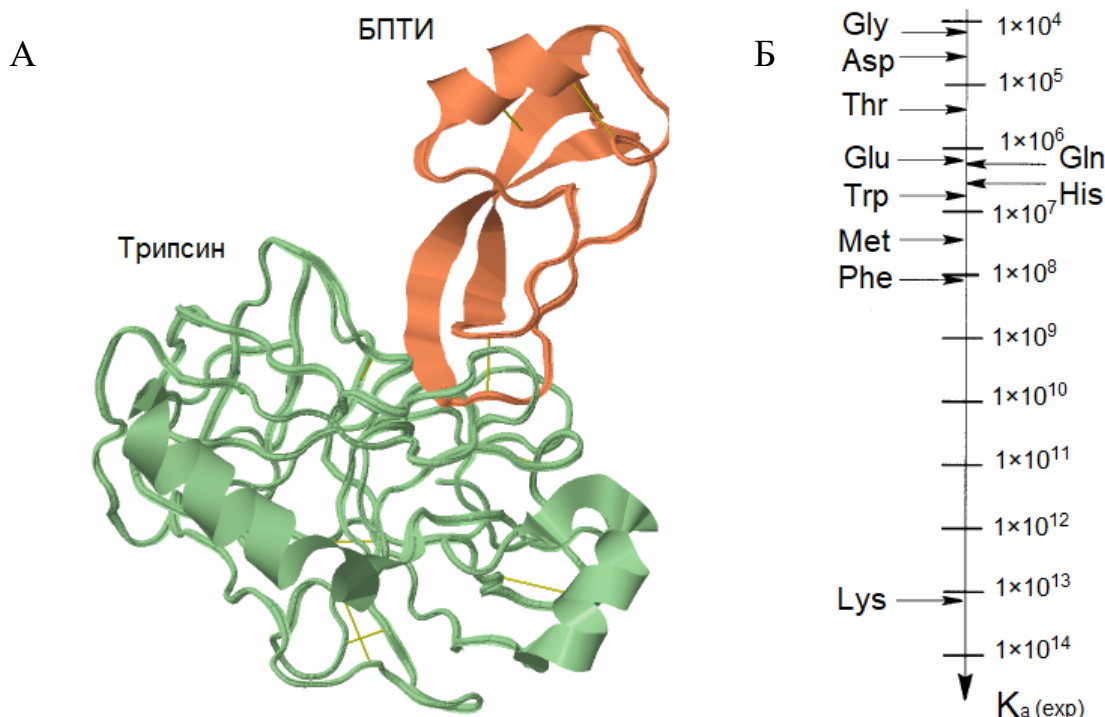


Рисунок 5 – (А) Пространственная структура комплекса БПТИ-трипсин (PDB ID 2PTC (Marquart et al., 1983)). (Б) Константы ассоциации (K_a , M^{-1}) комплексов между десятью мутантами БПТИ и трипсином (Helland et al., 1999).

Механизм взаимодействия реактивного сайта БПТИ с активным центром трипсина детально исследован. В центре канонической связывающей петли молекулы БПТИ расположен положительно заряженный остаток Lys15 (P1), боковая цепь которого проникает глубоко в активный центр трипсина и формирует электростатические взаимодействия с Asp189 (S1), в результате чего происходит образование стабильного комплекса ($K_i = 6 \times 10^{-14}$ M) (Krowarsch et al., 1999). Методом сайт-направленного мутагенеза были получены варианты ингибитора БПТИ с мутациями в положении P1 и исследованы особенности их взаимодействия с протеиназами. Установлено, что замена Lys15 в молекуле БПТИ на любой аминокислотный остаток кроме Arg приводит к увеличению значения K_a трипсина минимум на 6 порядков (Рисунок 5 Б). Ароматические, гидрофобные и полярные боковые цепи аминокислотных остатков в положении P1 способствуют формированию более устойчивых комплексов с трипсином, чем небольшие, разветвленные и отрицательно заряженные боковые цепи аминокислотных остатков (Helland et al., 1999).

Установлено, что ингибиторы протеиназ предотвращают воспаление и повреждение тканей, а также способствуют их ремоделированию (Shigetomi et al., 2010). БПТИ

обеспечивает защиту тканей при остром панкреатите и проявляет местное противовоспалительное действие (Ascenzi et al., 2003). Механизм его противовоспалительного действия связан с защитой рецептора PAR1 от активации тромбином, в результате чего блокируется выработка провоспалительных цитокинов (Day et al., 2006; Mercer et al., 2007). Помимо этого, БПТИ ингибирует продукцию мощного провоспалительного медиатора – оксида азота (II) (NO) (Hill et al., 1997; Venturini et al., 1998). Другим примером успешного использования пептидов Кунитц-типа в терапии является двудоменный ингибитор сериновых протеиназ человека – бикунин. Его применяют при лечении септического шока, панкреатита и эндovasкулярной коагуляции. Положительный эффект достигается за счет способности бикунина ингибировать трипсин, α -химотрипсин, эластазу лейкоцитов, плазмин, катепсин G, а также протеиназы каскада коагуляции. Исследования *in vitro* показали, что бикунин снижает уровень продукции таких мощных провоспалительных молекул, как тромбоксан B2, ФНО- α и ИЛ-8, индуцированной введением липополисахарида бактерий (ЛПС) (Shigetomi et al., 2010).

Среди пептидов Кунитц-типа животных встречаются ингибиторы протеиназ с необычной или расширенной специфичностью. Пептиды Кунитц-типа, обнаруженные в яде змей, ингибируют протеиназы, участвующие в процессе коагуляции крови (плазмин и тромбин) (Fry et al., 2009). В секрете слюнных желез клеща *Rhipicephalus appendiculatus* был обнаружен эффективный ингибитор β -триптазы человека, эндогенные ингибиторы которой отсутствуют. Благодаря взаимодействию с β -триптазой происходит подавление аллергической реакции при присасывании клеща (Paesen et al., 2007). Из клеща *Amblyomma cajennense* был выделен мультимономерный ингибитор активности фактора коагуляции крови Ха (Batista et al., 2010). Данный пептид селективно действует на опухолевые клетки и индуцирует их апоптоз, предположительно, в результате взаимодействия с компонентами убиквитин-протеасомной системы (Chudzinski-Tavassi et al., 2010). Из морского червя *Sabellastarte magnifica* был выделен трехдоменный пептид, являющийся бифункциональным ингибитором сериновых протеиназ и металлокарбоксипептидазы А (Alonso-del-Rivero et al., 2012). Пептид ShPI-I из актинии *S. helianthus* помимо сериновых (трипсин, α -химотрипсин, калликреин и эластаза нейтрофилов человека) может эффективно ингибировать цистеиновые (папаин) и аспарагиновые (пепсин) протеиназы (Delfin et al., 1996; Gil et al., 2011). Пептиды Кунитц-типа ядовитых животных в процессе эволюции приобрели способность не только ингибировать протеиназы, но и модулировать функцию различных ионных каналов и рецепторов (Na_v, K_v, Ca_v, TRPV1, ASICs, AVPR2) (Báez et al., 2015; Chaki et al., 1992; Ciolek et al., 2017; García-Fernández et al., 2016; Nikolaev et al., 2017; Peigneur et al., 2011; Stotz et al., 2000; Wang et al., 2012).

1.5 Ионные каналы – мишень токсинов Кунитц-типа ядовитых животных

Многоклеточным организмам необходимы механизмы быстрой и точной передачи информации между клетками и тканями для обеспечения тесной координации удаленных органов. У позвоночных регуляция сокращения мышц, секреции гормонов, работы органов чувств, обработки информации мозгом и ее передачи в периферические ткани осуществляется электрическими сигналами, вызывающими изменение концентрации ионов кальция внутри клеток. В невозбудимых клетках кальциевый сигналинг контролирует множество процессов, включая секрецию, экспрессию генов и деление клеток. Все эти физиологические процессы в значительной мере опосредованы потенциал-зависимыми ионными каналами. Они формируют надсемейство, насчитывающее 143 представителя (Рисунок 6), и, таким образом, являются одной из самых больших групп белков сигнальной трансдукции, занимая третье место после рецепторов, связанных с G-белками, и многочисленных протеинкиназ.

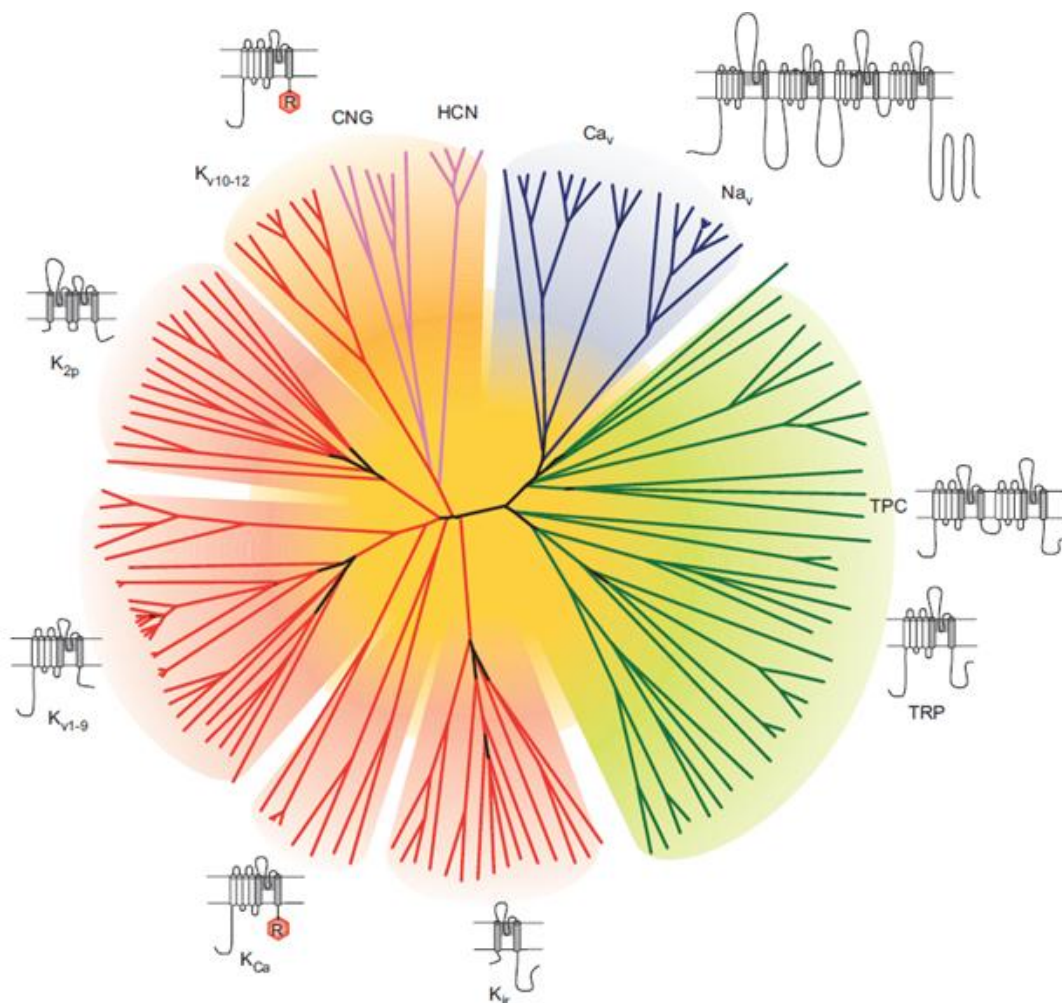


Рисунок 6 – Филогенетические взаимоотношения 143 представителей надсемейства потенциал-зависимых ионных каналов, выведенные на основании сравнения аминокислотных последовательностей минимального порового региона (отмечен серым на схематическом изображении молекул каналов) (Yu and Catterall, 2004).

Все члены надсемейства формируют пору аналогичной структуры, которая, как правило, ковалентно связана с регуляторными доменами, реагирующими на изменение напряжения мембраны и/или воздействие сигнальных молекул. В данное надсемейство включено 8 семейств: потенциал-зависимые натриевые, кальциевые и калиевые каналы (Na_v , Ca_v , K_v), калиевые каналы входящего выпрямления (K_{ir}), калиевые каналы с двумя поровыми участками (K_{2p}), Ca^{2+} -активируемые калиевые каналы (K_{Ca}), каналы, модулируемые циклическими нуклеотидами (CNG и HCN), каналы транзитного рецепторного потенциала (TRP) (Yu et al., 2005; Yu and Catterall, 2004). Так как мишенями пептидов Кунитц-типа актиний являются K_v и TRPV1, они будут рассмотрены подробнее.

1.5.1 Структура и функции K_v

Калиевые каналы кодируются более чем 70 генами и являются наиболее многочисленным семейством ионных каналов. Они подразделяются на четыре класса (Gutman et al., 2005): K_{ir} (Hibino et al., 2010; Kubo et al., 2005), K_{2p} (Goldstein et al., 2005; Plant et al., 2005), K_{Ca} (Kaczmarek et al., 2017; Salkoff et al., 2006; Wei et al., 2005) и K_v (Gutman et al., 2005). Последние представляют собой самую обширную группу калиевых каналов, состоящую из 12 подсемейств ($\text{K}_v1.x$ – $\text{K}_v12.x$), кодирующихся 40 генами (Alexander et al., 2015; Gutman et al., 2005). Функционально активный K_v образован четырьмя, обычно идентичными, ионопроводящими α -субъединицами (Рисунок 7).

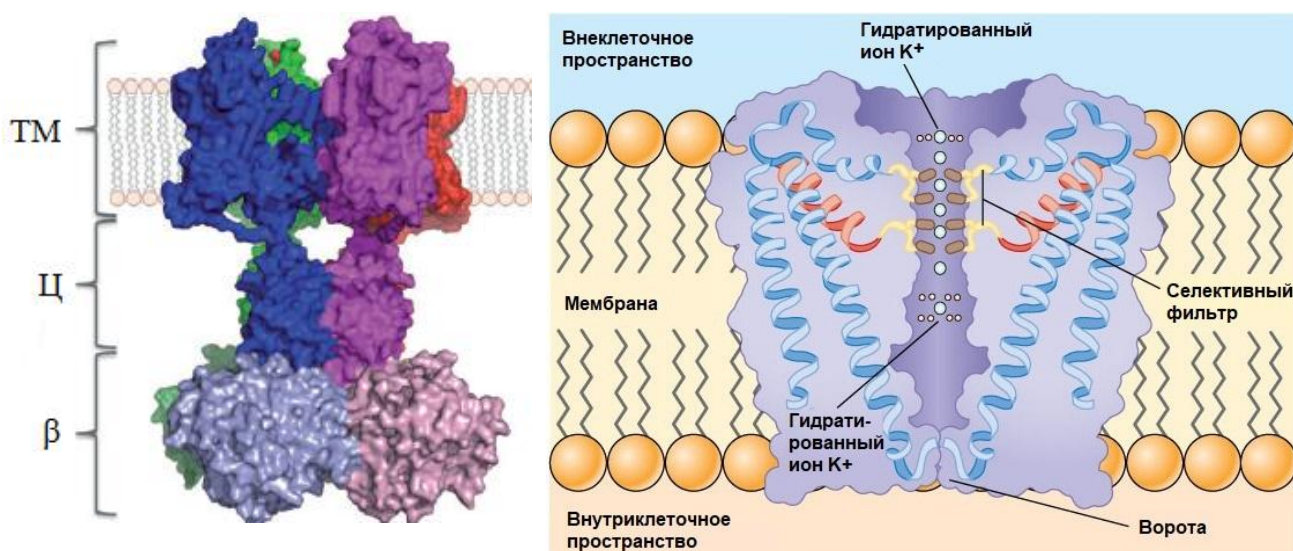


Рисунок 7 – Слева изображена пространственная организация K_v на примере химеры $\text{K}_v1.2/\text{K}_v2.1$ (KCNA2/KCNB1 код в базе данных пространственных структур пептидов (PDB ID 2R9R) (Long et al., 2005). TM – трансmemбранный домен, Ц – цитоплазматический домен, образованные четырьмя α -субъединицами, β – β -субъединицы. Справа – схематическое изображение K_v в клеточной мембране (Grizel et al., 2014).

Трансмембранные домены α -субъединиц представлены шестью сегментами (S1–S6), которые образуют две структурно и функционально разные части тетрамерного канала. Сегменты S5–S6 локализованы в центре канала и участвуют в образовании порового домена, а S1–S4 находятся на периферии канала и входят в состав домена, чувствительного к изменению потенциала на мембране (Long et al., 2005). K_v обладают высокой избирательностью, которая достигается благодаря консервативному мотиву (TTVG YGD) селективного фильтра, присутствующему в структуре всех K^+ каналов (Heginbotham et al., 1994). Пропускная способность K^+ каналов очень высока и близка к пределу диффузии, открытый канал способен пропускать 10^6 – 10^8 ионов K^+ в секунду (Zhou et al., 2001). В клеточных мембранах K_v существуют в форме макромолекулярных комплексов, включающих в себя формирующие канал α -субъединицы, ассоциированные со вспомогательными цитоплазматическими β -субъединицами (Рисунок 7) (Leicher et al., 1998). Вспомогательные β -субъединицы модулируют свойства и функции α -субъединиц, а цитоплазматический домен принимает участие в регуляции работы канала и тетрамеризации α -субъединиц (Barrós et al., 2012). В формировании тетрамерного канала могут участвовать как идентичные α -субъединицы, так и различные, но набор таких комбинаций ограничен. Сложность структурных форм потенциал-зависимых калиевых каналов определяет большое разнообразие их электрофизиологических свойств и биологических функций (Wray, 2004).

Большинство потенциал-зависимых калиевых каналов отвечает за поддержание мембранного потенциала и модуляцию электрической возбудимости нейронов и мышечных клеток (Gutman et al., 2005). Каналы субсемейства $K_v1.1$ обнаружены в мембранах клеток головного мозга, сердца, сетчатки глаза, скелетной мускулатуры и островков Лангерганса (Beckh and Pongs, 1990; Klumpp et al., 1991; Roberds and Tamkun, 1991; Tsaur et al., 1992). $K_v1.2$ экспрессируются в головном и спинном мозге, Шванновских клетках, клетках островков Лангерганса, сердце, сетчатке и гладкой мускулатуре (Roberds and Tamkun, 1991; Sheng et al., 1994; Sobko et al., 1998). Дисфункцию $K_v1.1$ или $K_v1.2$ каналов связывают с такими заболеваниями, как эпизодическое нарушение координации движений (атаксия) и нервный тик (Gutman et al., 2005; Kozlov, 2017). $K_v1.3$ экспрессируются в мозге, клетках микроглии, олигодендроцитах, фибробластах, остеокластах, легких, тимусе, клетках островков Лангерганса, селезенке, лимфатических узлах, семенниках, макрофагах, В- и Т-лимфоцитах (Arkett et al., 1994; DeCoursey et al., 1996; Douglass et al., 1990; Grissmer et al., 1990; Gutman et al., 2005; Stühmer et al., 1989). Этот канал рассматривают в качестве терапевтической мишени, воздействие на которую может способствовать лечению аутоиммунных и онкологических заболеваний (Felipe et al., 2012; Rangaraju et al., 2009). Пептидный блокатор $K_v1.3$, ShK-186, созданный на основе природного токсина (Castañeda et

al., 1995), ингибирует кальциевый сигналинг аутореактивных Т-клеток, что приводит к снижению продукции цитокинов и подавлению пролиферации. При этом данный пептид не влияет на функционирование нормальных Т-клеток (Beeton et al., 2006). На основе ShK-186 разрабатывается препарат для лечения аутоиммунных заболеваний (Chi et al., 2012; Shen et al., 2017). Недавно было показано, что $K_v1.3$ экспрессируются не только в клеточной мембране, но и в мембранах митохондрий и участвуют в пролиферации опухолевых клеток (Rao et al., 2015). Ингибирование данной изоформы каналов антагонистами, проникающими через клеточную мембрану, индуцирует гибель опухолевых клеток (Leanza et al., 2012). $K_v1.5$ экспрессируются в мозге, аорте, сердце, толстом кишечнике, почках, желудке, гладкой мускулатуре и принимают участие в пролиферации некоторых опухолей (Felipe et al., 2012; Gutman et al., 2005). Каналы $K_v1.4$, $K_v1.6$, $K_v1.7$ и $K_v1.8$ экспрессируются преимущественно в мозге, мышцах и сердце (Gutman et al., 2005). Таким образом, потенциал-зависимые калиевые каналы присутствуют практически во всех тканях организма человека, а нарушение их функционирования приводит к развитию патологических процессов, поэтому модуляторы их активности вызывают большой интерес.

1.5.2 Пептиды Кунитц-типа – блокаторы $K_v1.x$

На сегодняшний день в яде многих животных были обнаружены пептиды Кунитц-типа, блокирующие потенциал-зависимые калиевые каналы. Среди них встречаются как действующие специфично токсины, так и взаимодействующие с несколькими изоформами K_v (Таблица 1). Первые пептиды с фолдом Кунитца, блокирующие K_v , были обнаружены в 1970-х годах в яде змей и названы дендротоксинами (DTX) (Рисунок 8) (Harvey and Anderson, 1985). Они представлены рядом гомологов, среди которых встречаются как бифункциональные пептиды, способные ингибировать активность протеиназ и блокировать K_v , так и пептиды, которые только блокируют K_v . Так, DTX I из яда *Dendroaspis polylepis* блокирует $K_v1.1$ и $K_v1.2$ и слабо ингибирует α -химотрипсин (~5% от активности БПТИ) (Lancelin et al., 1994). DTX- α из яда *Dendroaspis angusticeps* блокирует $K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v1.6$, а также ингибирует токи кислото-чувствительных ионных каналов (ASICs) (Báez et al., 2015; Harvey, 2001). За взаимодействие DTX- α с K_v отвечают 6 а.о., расположенных в N-концевой части молекулы, Arg3, Arg4, Leu6, Lys5, Ile8, Leu9 (Рисунок 9). Наиболее важными являются остатки Lys5 и Leu9, их замена на Ala приводит к тысячекратному уменьшению аффинности токсина. Замена остатков Arg3, Arg4, Leu6 и Ile8 уменьшает аффинность токсина в 5–30 раз. Некоторые остатки на C-конце молекулы также являются значимыми для взаимодействия с

каналом. Так, замена Arg46Ala уменьшает аффинность токсина в 200 раз, а замена Ser38Ala – в 6 раз (Gasparini et al., 1998).

	1	10	P1 20	30	40	50	68	%
SHPI-1	-----SICSEPKVGRCKGYFPRFYFDSETGKCTPFIYGGCGGNGNFFETLHQCRAICRA-----							100
APEKTx1	---INSICLLPKKQGFRCRARFPRFYYSSTRCEMFYGGCGGNANNFNTLEECEKVCLGYGEAWKAP							56
AsKC1	---INKDCLLPMDVGRCRASHPRYYYNSSSKRCEKFIYGGCGRGNANNFHTLEECEKVCVGR-----							47
AsKC2	---INKDCLLPMDVGRCRARHPRYYYNSSSRRCEKFIYGGCGRGNANNFHTKECEKVCVGR-----							45
AsKC3	---INGDCLEPKVVGRCRARFPRYYYNLSSRRCEKFIYGGCGGNNANNFHTLEECEKVCVGRS-----							51
SHTXIII	TEEMPALCHLQPDVVKCRGYFPRYYYNPVEVGKCEQFIYGGCGGKNNFVFSFEACRATCIIPL-----							53
Conk-S1	-KDRPSLCDLFADSGSGTKAEKRIYYNSARKQCLRFDTYGQGGNENNFRTYDCQRTCLYT-----							34
Hg1	GHHNRVNCILLPPKTGPCKGSFARYYFDIETGSKAFIYGGCEGNSNNFSEKHHCEKRCRGFRKFGGK-							56
LmKTT-1a	-----KKCQLPSDVGGKASFTYYYNEESGKCEFTFIYGGVGGNSNNFLTKECCRECAQGS-----							47
HWTX-XI	----IDTCRLPSDRGRCKASFERWYFNG--RTCAKFIYGGCGGNGNKFTQECMKRCAKA-----							49
DTX1	-QPLRLKLCILHRNPGRCYQKIPAFYYNQKKKQCEGFTWSGCGGNSNRFTIEECRRTCIRK-----							42
DTX-α	-QPRRLKLCILHRNPGRCYDKIPAFYYNQKKKQCEFDWSGCGGNSNRFTIEECRRTCIG-----							36
DTX K	---AAKYCKLPLRIGPCKRKIPSFYYKWKAKQCLPFDYSGCGGNANRFTIEECRRTCVG-----							36
DTX-δ	---AAKYCKLPVRYGPCKKKIPSFYYKWKAKQCLPFDYSGCGGNANRFTIEECRRTCVG-----							42
BPTI	---RPDFCLEPPYTGPCKARIIRYFYNAKAGLCQTEVYGGCRAKRNNEKSAEDCMRTCGGA-----							34
	*****				*****			
	Реактивный сайт			Сайт слабых взаимодействий				

Рисунок 8 – Выравнивание АП пептидов Кунитц-типа, блокаторов K_v и БПТИ (BPTI): APEKTx1 (P61541) из актинии *A. elegantissima* (Peigneur et al., 2011), AsKC1–AsKC3 (Q9TWG0, Q9TWF9, Q9TWF8) из актинии *A. sulcata* (Schweitz et al., 1995), ShPI-1(P31713) из актинии *S. helianthus* (Delfin et al., 1996), SHTXIII (B1B518) из актинии *S. haddoni* (Honma et al., 2008), HWTX-XI (P68425) из паука *O. huwena* (Jiang et al., 2014), LmKTT-1a (P0DJ46) из скорпиона *L. mucronatus* (Chen et al., 2013), Hg1 (P0C8W3) из скорпиона *H. gertschi* (Chen et al., 2012), DTX1 (P00979), DTX-K (P00981) из змеи *D. polylepis* (Harvey, 2001; Owen et al., 1997), DTX-α (P00980) из змеи *D. angusticeps* (Harvey, 2001), DTX-δ (P00982) из *D. angusticeps* (Imredy and MacKinnon, 2000), Conk-S1 (P0C1X2) из моллюска *C. striatus* (Bayrhuber et al., 2005), BPTI (P00974) из *B. taurus* (Helland et al., 1999). Идентичные а.о. показаны на темно-сером фоне, консервативные – светло-сером.

Таблица 1 – Концентрация полумаксимального ингибирования K_v пептидами Кунитц-типа ядовитых животных

Пептид	IC ₅₀ (нМ)					Ссылка
	K _v 1.1	K _v 1.2	K _v 1.3	K _v 1.6	Shaker IR	
ShPI-1	117±15	9±2	-	9±2	-	(García-Fernández et al., 2016)
APEKTx1	0,9	-	-	-	-	(Peigneur et al., 2011)
AsKC1	-	2800	-	-	-	(Schweitz et al., 1995)
AsKC2	-	1100	-	-	-	(Schweitz et al., 1995)
AsKC3	-	1300	-	-	-	(Schweitz et al., 1995)
SHTXIII	-	270*	-	-	-	(Honma et al., 2008)
DTX-α	1,1	0,4	-	9	-	(Harvey, 2001)
DTX1	3,1	0,13	±	-	-	(Harvey, 2001)
DTX-K	0,03	-	-	-	-	(Owen et al., 1997)
DTX-δ	0,01					(Imredy and MacKinnon, 2000)
Conk-S1	-	-	-	-	60	(Bayrhuber et al., 2005)
LmKTT-1a	-	-	>1000	-	-	(Chen et al., 2013)
Hg1	-	-	6,2	-	-	(Chen et al., 2012)
HWTX-XI	-	-	2,6×10 ⁵	-	-	(Jiang et al., 2014)

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

DTX-K из яда черной мамбы *D. polylepis* является одним из мощнейших блокаторов $K_v1.1$ (Таблица 1) (Owen et al., 1997). Установлено, что во взаимодействии DTX-K с каналом принимают участие остатки Lys3 и Lys6 спирали 3_{10} , а также Trp25 и Lys26 β -изгиба (Рисунок 8) (Smith et al., 1997; Wang et al., 1999). Высказано предположение, что остаток Lys3 отвечает за специфичность токсина, так как его замена на Ala приводит к уменьшению аффинности к $K_v1.1$ в 1246 раз, а аффинность к $K_v1.2$ уменьшается лишь в 16 раз (Wang et al., 1999). Последовательность DTX- δ из *D. angusticeps* на 95% идентична таковой DTX-K, что обуславливает его высокую специфичность к $K_v1.1$ (Benishin et al., 1988). Для DTX- δ были получены мутантные аналоги и проведено исследование их взаимодействия с бактериальным $K_v1.1$ (KcsA), пространственная структура которого была определена с помощью рентгеноструктурного анализа. Было установлено, что во взаимодействии DTX- δ с каналом участвует треугольный участок поверхности, сформированный боковыми цепями семи аминокислотных остатков (Lys3, Tyr4, Lys6, Leu7, Pro8, Arg10, Lys26). DTX- δ взаимодействует с боковыми цепями остатков вблизи поры с внеклеточной стороны канала и делает структуру поры более жесткой, что затрудняет прохождение ионов через канал. Таким образом, в отличие от токсина скорпиона *Leiurus quinquestriatus hebraeus* (Agitoxin2), имеющего другой тип пространственной укладки, дендротоксины изменяют динамическую структуру канала, не являясь при этом физической «затычкой» поры канала (Рисунок 9) (Imredy and MacKinnon, 2000).

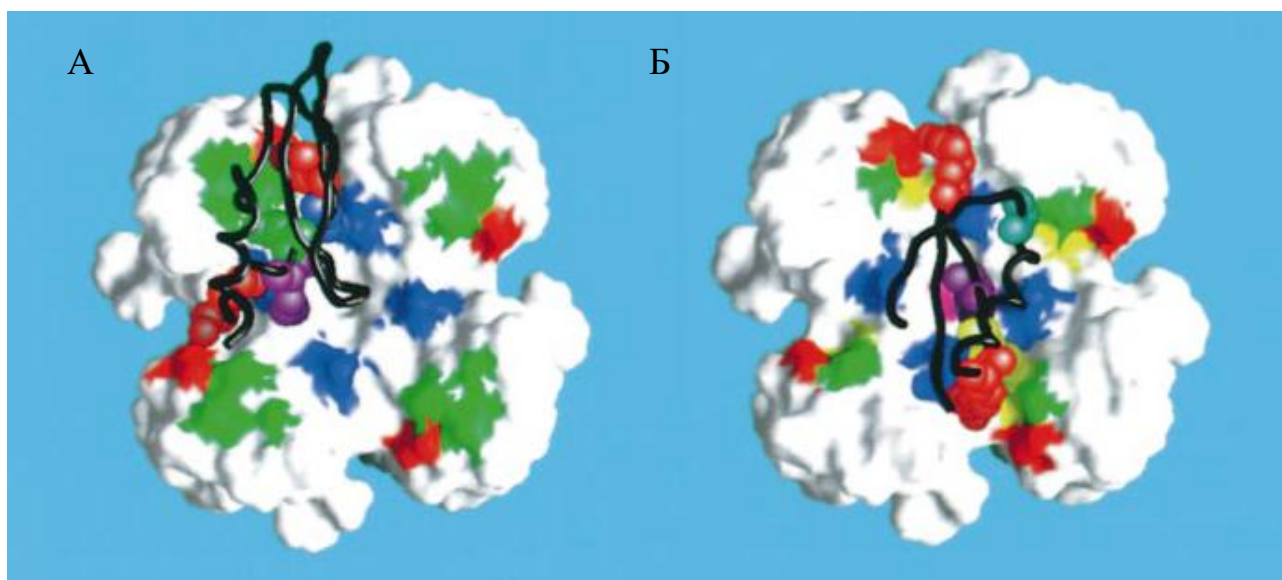


Рисунок 9 – Теоретические модели взаимодействия (А) DTX- δ (P00982) из *D. angusticeps* и (Б) Agitoxin2 (P46111) из *L. quinquestriatus hebraeus* с K_v . Вид на канал сверху на внеклеточный вход в пору канала. DTX- δ и Agitoxin2 показаны черными линиями. Остаток Lys27 токсина Agitoxin2 имитирует ион K^+ и преграждает путь ионов, в то время как DTX- δ взаимодействует с поверхностью канала, окружающей пору (Imredy and MacKinnon, 2000).

В яде пауков пептиды Кунитц-типа кодируются мультигенными семействами, насчитывающими десятки изоформ, среди которых был обнаружен только один блокатор K_v (Jiang et al., 2014; Yuan et al., 2008). Хувентоксин-XI (HWTX-XI) из *Ornithoctonus huwena*, является слабым блокатором $K_v1.1$ и мощным ингибитором трипсина ($K_i = 2,8 \times 10^{-10}$ М) (Jiang et al., 2014). В яде скорпионов пептиды Кунитц-типа также кодируются мультигенными семействами и насчитывают десятки изоформ. Пептиды Hg1 из *Hadrurus gertschi* и LmKTT-1a из *Lychas mucronatus* специфически и эффективно ингибируют трипсин. Оба пептида блокируют $K_v1.3$, но IC_{50} пептида Hg1 на три порядка меньше, чем пептида LmKTT-1a (Chen et al., 2012). Характерной особенностью LmKTT-1a является неканоническое расположение остатков цистеина и дисульфидных связей (Chen et al., 2013). Конкунитцин-S1 (Conk-S1), выделенный из *Conus stratus*, интересен не только своей способностью блокировать K_v , но и структурой, в которой присутствуют только две консервативные дисульфидные связи. В молекуле токсина Conk-S1 остатки Cys^{II} и Cys^{IV} замещены остатками Gly и Gln (Рисунок 9) (Bayrhuber et al., 2005).

Некоторые ингибиторы Кунитц-типа актиний также блокируют потенциал-зависимые калиевые каналы (Таблица 1, Рисунок 9). Например, три пептида из *A. sulcata*, AsKC1–AsKC3, блокируют $K_v1.2$ и ингибируют трипсин (Schweitz et al., 1995). АРЕКТx1 из *A. elegantissima* блокирует $K_v1.1$, не уступая по эффективности дендротоксинам змей, но при этом он сохраняет способность эффективно ингибировать трипсин (Peigneur et al., 2011). Установлено, что ингибитор трипсина SHTXIII из *S. haddoni* ингибирует связывание меченого DTX-α с синаптосомальной мембраной крысы, что свидетельствует о его способности блокировать $K_v1.2$. По-видимому, SHTXIII блокирует не только K_v млекопитающих, но и ракообразных, так как обладает паралитическим действием на крабов (Honma et al., 2008). Пептид ShPI-1 из актинии *S. helianthus* интересен тем, что не только ингибирует протеиназы разных классов, но также эффективно блокирует три изоформы K_v ($K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v1.6$) (García-Fernández et al., 2016). Несмотря на то, что пространственная структура ShPI-1 известна, молекулярный механизм его взаимодействия с потенциал-зависимыми калиевыми каналами еще не изучен.

1.5.3 Ионотропный рецептор TRPV1, структура и функции

Семейство катионных каналов TRP подразделяется на семь подсемейств: TRPC (Canonical), TRPM (Melastatin), TRPV (Vanilloid), TRPA (Ankyrin), TRPP (Polycystin) и TRPML (Mucolipin) и TRPN (Drosophila NOMPC (No mechanoreceptor potential C)) (Madej and Ziegler, 2018). Подсемейство TRPV включает в себя шесть представителей, TRPV1–TRPV6,

при этом TRPV1 является наиболее хорошо охарактеризованным с точки зрения структуры и функции. TRPV1 представляет собой неселективный катионный канал, который активируется термическим воздействием ($t^\circ > 43^\circ \text{C}$), протонами ($\text{pH} < 5,3$), эндогенными и экзогенными ваниллоидами, медиаторами воспаления липидной природы, а также токсинами растений и животных (Bevan et al., 2014). Пространственная структура TRPV1 во многом схожа со структурой K_v . Функционально активный канал образован четырьмя идентичными субъединицами, каждая из которых содержит шесть трансмембранных сегментов (S1–S6). Четыре из них (S1–S4) принимают участие в формировании регуляторного домена, а два (S5–S6) – порового домена (Рисунок 10) (Hellmich and Gaudet, 2014).

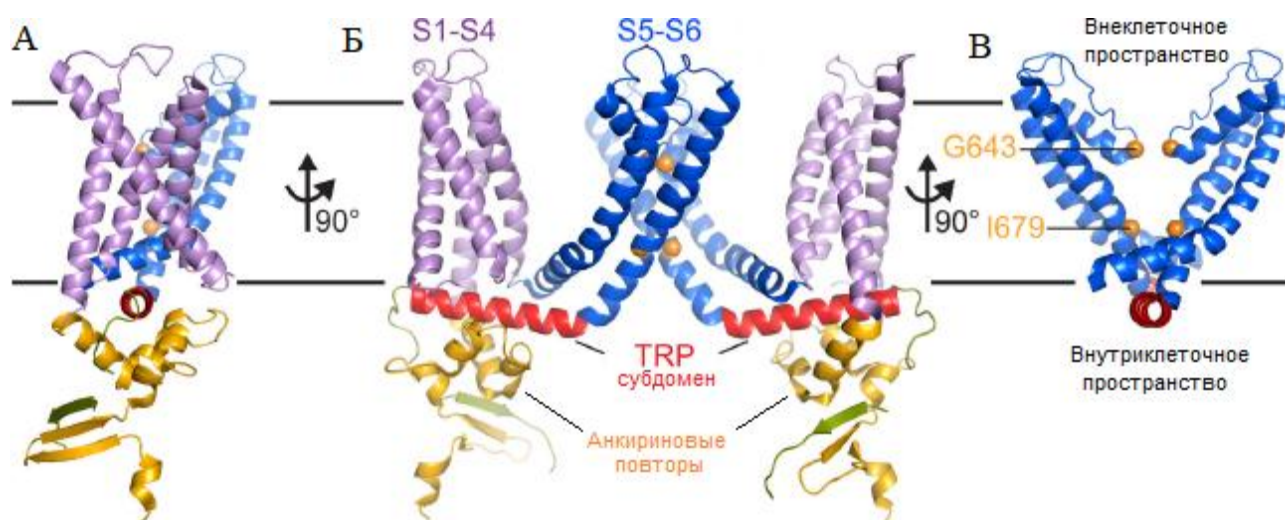


Рисунок 10 – (А, Б) Модель пространственной ориентации TRPV1 в мембране и цитоплазме, (В) спирали S5 и S6 формируют поровый домен, показаны а.о. Gly643 и Ile679, формирующие верхние и нижние ворота канала (Hellmich and Gaudet, 2014).

Селективный фильтр ионотропного рецептора TRPV1 значительно короче селективного фильтра потенциал-зависимых калиевых каналов (Hellmich and Gaudet, 2014), вследствие чего проницаемость TRPV1 практически одинакова для катионов Na^+ , K^+ , Cs^+ , Li^+ , Ca^{2+} и Mg^{2+} (Samways and Egan, 2011). Более того, для TRPV1–TRPV4 показано явление сверхпроницаемости, в результате которой через активированный канал в клетку могут проникать молекулы с молекулярной массой до 900 Да, например, цитостатических препаратов и флуоресцентных зондов (Ferreira and Faria, 2016). TRPV1 проявляет слабую чувствительность к изменению мембранного потенциала (Bevan et al., 2014). За чувствительность канала к изменениям температуры отвечают N- и C-концевые внутриклеточные фрагменты АП, а также структурные элементы порового домена (Valente et al., 2008; Vlachova et al., 2003; Yang et al., 2010). Цитоплазматический домен TRPV1 (Рисунок 10 Б) сильно отличается от такового K_v , он включает в себя субдомен TRP и шесть анкириновых повторов, расположенных на C-концевом фрагменте молекулы. Субдомен TRP

обуславливает конформационные изменения, возникающие при связывании ваниллоидов (капсаицин, резинифератоксин), активирующих TRPV1 (Hellmich and Gaudet, 2014). Показано, что анкириновые повторы участвуют в сборке канала, они содержат сайты взаимодействия с кальмодулином, протеинкиназой А и АТФ (Bevan et al., 2014; Lishko et al., 2007). TRPV1 экспрессируется в половине всех соматических и висцеральных чувствительных нейронов. Канал был обнаружен в дофаминэргических нейронах черного вещества, гипоталамусе, голубоватом пятне, пирамидальных нейронах гиппокампа, а также в различных слоях коры головного мозга. TRPV1 отвечает за терморегуляцию и передачу болевых стимулов, возникающих в результате нагревания или взаимодействия с агонистами, активирующими канал (Bevan et al., 2014). TRPV1 был обнаружен не только в нервных клетках, но и в мембранах кератиноцитов, клеток иммунной системы, гладкой мускулатуры, печени и поджелудочной железы. TRPV1 контролирует кровоток в скелетных мышцах и в некоторых терморегулируемых тканях, таких как кожа, трахея и мышцы кремастера (Cavanaugh et al., 2011; Kark et al., 2008). При исследовании многих заболеваний, включая воспаление кишечника, ожирение, диабет и рак, были отмечены активация, сенсibilизация и модуляция TRPV1 (Brown et al., 2005; Suri and Szallasi, 2008; Yiangou et al., 2001). Наряду с H1-гистаминовым рецептором и PAR2, TRPV1 участвует в патогенезе контактного дерматита (Nakagawa and Hiura, 2013). В большинстве клеток TRPV1 экспрессируется в комплексе с TRPA1, где они оказывают физическое и химическое воздействие друг на друга, реагируют на большое количество стимулов и участвуют в развитии и поддержании воспалительного процесса (Gouin et al., 2017).

1.5.4 Пептиды Кунитц-типа – антагонисты TRPV1

На сегодняшний день известно три пептида Кунитц-типа, модулирующих активность TRPV1, все они выделены из актинии *H. crispa* и отличаются точечными заменами аминокислотных остатков. Первый пептидный антагонист TRPV1, APHC1, был выделен в 2008 году из актинии *H. Crispa* (Andreev et al., 2008), затем из ее яда было выделено еще два антагониста, APHC2 и APHC3 (Andreev et al., 2013; Kozlov et al., 2009). Установлено, что APHC2 является наиболее слабым антагонистом, поэтому детальное исследование его активности не проводилось. APHC1 и APHC3 ингибируют канал, активированный капсаицином, лишь частично (до 50%) (Рисунок 15 А), при этом пептиды проявляют умеренную трипсинингибирующую активность (константы ингибирования равняются 1×10^{-6} и 5×10^{-7} М соответственно). APHC3 выгодно отличается тем, что ингибирует TRPV1, активированный в результате понижения pH, свойственного для очага воспаления (Andreev

et al., 2013). Пептид InhVJ, также выделенный из *H. crisper*, несмотря на высокую идентичность АП (до 95%) относительно последовательностей APHC1–APHC3, не модулирует TRPV1 (Рисунок 11) (Gladkikh et al., 2012).

	1	10	P1	20	30	40	58	%
APHC1	-GSICLEPKVVGPC	TAYFR	RFYFD	SETGKCTVFI	YGGCEGNGNN	FETLRACRAICRA	-	100
APHC2	-GSICLEPKVVGPC	TAYFR	RFYFD	SETGKCTPFI	YGGCEGNGNN	FETLRACRAICRA	-	98
APHC3	-GSICLEPKVVGPC	TAYFR	RFYFN	SETGKCTPFI	YGGCEGNGNN	FETLRACRGICRA	-	93
InhVJ	-GSICLEPKVVGPC	TAYFR	RFYFD	SETGKCTPFI	YGGCEGNGNN	FETLHACRAICRA	-	95
BPTI	RPDFCLEP	PYTGPKARI	IRYFYNAKAGLCQ	TFVYGGCRAKRNN	FKSAEDCMRTCGGA			38
	*****				*****			
	Реактивный сайт				Сайт слабых взаимодействий			

Рисунок 11 – Выравнивание АП пептидов Кунитц-типа *H. crisper*: APHC1 (B2G331) (Andreev et al., 2008), APHC2 (C0HJF4), APHC3 (C0HJF3) (Kozlov et al., 2009), InhVJ (P0DMJ5) (Gladkikh et al., 2012), BPTI (P00974) из *B. taurus* (Helland et al., 1999). Идентичные а.о. показаны на темно-сером фоне, консервативные – на светло-сером. Остаток P1 реактивного сайта пептидов Кунитц-типа указан над последовательностями.

Недавно было показано, что при активации TRPV1 низкими дозами капсаицина (2–300 нМ) APHC1 и APHC3 усиливают его эффект, и ток ионов через канал возрастает (до 250%). При добавлении капсаицина в более высоких концентрациях (> 3 мкМ) APHC1 и APHC3 ингибируют ток ионов. APHC3 также способен потенцировать активацию TRPV1 слабым закислением (рН 6,2). Было высказано предположение, что пептидные антагонисты могут стабилизировать канал, находящийся во время активации в промежуточном состоянии. Согласно данным молекулярного моделирования, APHC1–APHC3 взаимодействуют с внешними петлями TRPV1 и могут оказывать прямое влияние на участок связывания с протонами и аллостерическое – на цитоплазматический участок связывания с капсаицином. Ключевыми остатками взаимодействия пептидов с TRPV1 предположительно являются Lys28, Glu45, а также остатки С-концевой спирали (Arg48, Arg51 и Arg55), вносящие наибольший энергетический вклад в связывание (Рисунок 12) (Nikolaev et al., 2017). Пептиды APHC1 и APHC3 в малых дозах (0,01–0,1 мг/кг) проявляют анальгетический эффект в моделях стимуляции боли *in vivo*. Они значительно уменьшают чувствительность мышей к воздействию высоких температур и введению уксусной кислоты (Andreev et al., 2013). Действие APHC1 на организм экспериментальных мышей сопровождается понижением температуры тела на 2 °С, а при введении APHC3 температура тела остается неизменной, в то время как низкомолекулярный антагонист TRPV1, AMG9810, напротив, повышает температуру тела на 2 °С (Рисунок 13 Б), что является крайне нежелательным побочным эффектом (Andreev et al., 2013). Пептид APHC3 был определен как наиболее перспективный кандидат для создания препарата, сочетающего анальгетическое и противовоспалительное действие. В настоящее время разработана схема получения рекомбинантного APHC3 в препаративных количествах для проведения клинических испытаний (Esipov et al., 2017).

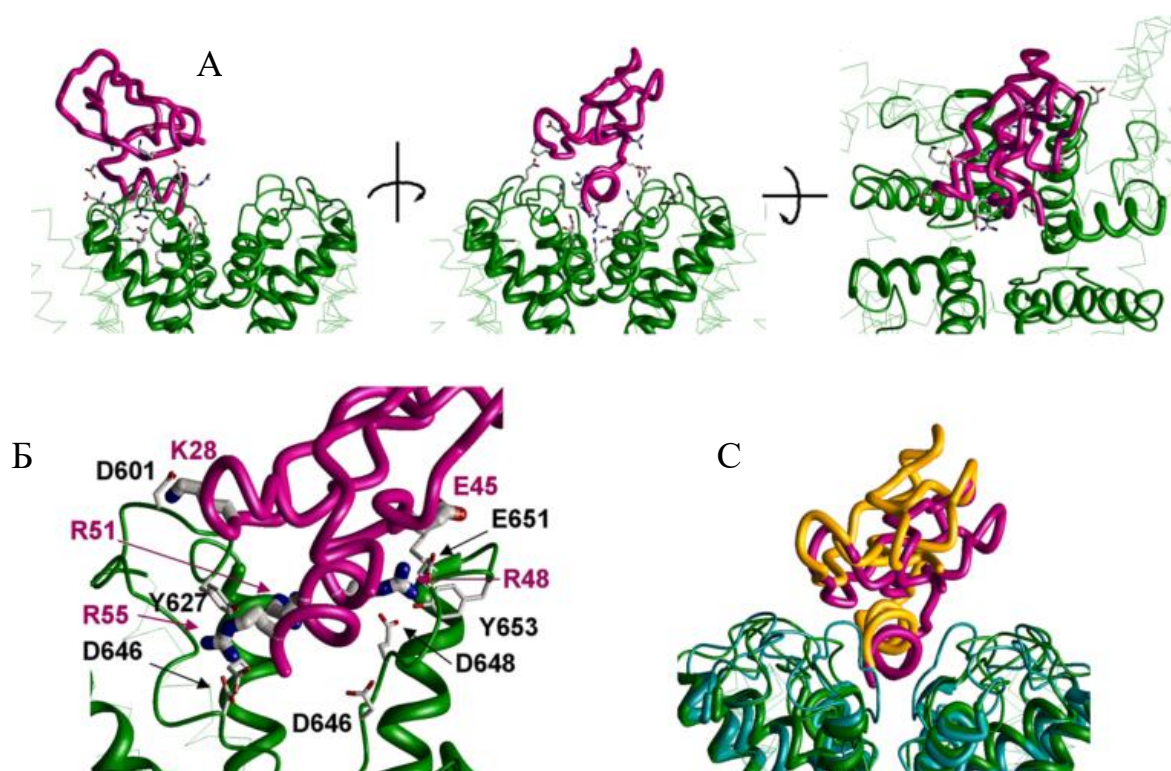


Рисунок 12 – Модель комплекса АРНС1 с внеклеточной частью TRPV1 (Nikolaev et al., 2017). (А) Комплекс АРНС1 (розовый) и TRPV1 (зеленый). (Б) Детали взаимодействия АРНС1 с каналом. Показаны боковые цепи ключевых остатков, вовлеченных во взаимодействие. (С) Суперпозиция структурных моделей комплексов АРНС1 и TRPV1 в закрытом состоянии (розовый и зеленый) и в открытом состоянии (оранжевый и бирюзовый).

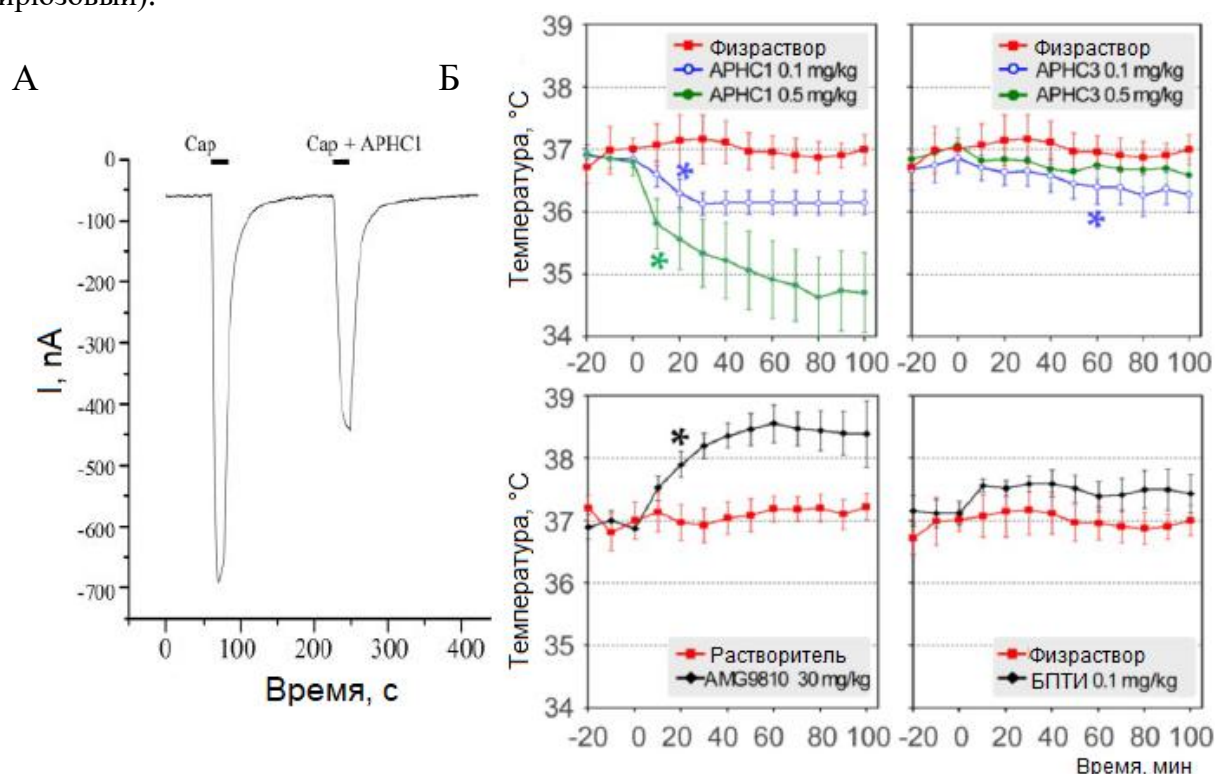


Рисунок 13 – (А) Электрофизиологическое исследование влияния АРНС1 на ток ионов через TRPV1, активированный добавлением 2 мкМ капсаицина (CAP) (Andreev et al., 2008). (Б) Влияние АРНС1, АРНС3, АМГ9810 и БПТИ на температуру тела мышей (Andreev et al., 2013).

1.6 Пептиды Кунитц-типа актинии *H. crisper*

Изучение пептидов Кунитц-типа актинии *H. crisper* началось в лаборатории химии пептидов ТИБОХ ДВО РАН с выделения в 1985 году пептида Jn-IV, установления его аминокислотной последовательности и определения активности (Zykova et al., 1985). Позже из актинии *H. crisper* было выделено еще шесть ингибиторов протеиназ Кунитц-типа, InhVJ, RmIn-I, RmIn-II, APHC1–APHC3 (Andreev et al., 2008; Gladkikh et al., 2012; Kozlov et al., 2009; Sokotun et al., 2007). Оказалось, что пептиды RmIn-I и RmIn-II обладают антигистаминной активностью (Sokotun et al., 2007), а APHC1–APHC3 модулируют TRPV1, вследствие чего оказывают анальгетическое действие *in vivo* (Andreev et al., 2013). Все выделенные из *H. crisper* пептиды обладают близкими молекулярными массами и высоким процентом идентичности аминокислотных последовательностей, что характерно для пептидов, кодируемых мультигенными семействами. Мультигенные семейства пептидов Кунитц-типа были обнаружены у змеи *Vipera ammodytes* (Župunski et al., 2003), скорпиона *Androctonus bicolor* (Zhang et al., 2015), пауков *Ornithoctonus huwena* и *Ornithoctonus hainana* (Yuan et al., 2008), а также клеща *Ixodes scapularis* (Dai et al., 2012).

Методами молекулярной биологии было установлено, что гены, кодирующие пептиды Кунитц-типа актинии *H. crisper*, формируют мультигенное семейство, которое состоит из четырех субсемейств. Они были названы согласно дипептидам, расположенным на N-конце пептидов, GS-, RG-, GG- и IQ-субсемействами. Также было обнаружено субсемейство, названное HCTX (*Heteractis crisper* toxins), последовательности которого высокоидентичны токсину SHTXIII из актинии *S. haddoni*, блокатору потенциал-зависимых калиевых каналов (Isaeva et al., 2012; Чаусова, 2012). Все нативные пептиды, выделенные из *H. crisper*, на данный момент относятся к субсемейству GS-пептидов, для которого с помощью техники быстрой амплификации кДНК концов (3', 5'-RACE) установлены последовательности 33 генов. Аналогичными методами для субсемейства RG-пептидов также были установлены последовательности 33 генов, а для субсемейства HCTX – последовательности 6 генов (Рисунок 14) (Чаусова, 2012).

Исследование организации генов надсемейства показало, что открытую рамку считывания прерывает один интрон, расположенный между высоконсервативным сигнальным пептидом и вариабельной последовательностью, кодирующей зрелый пептид Кунитц-типа. Согласно литературным данным, участки генов, разделенные интроном, могут мутировать с разной скоростью, как было описано ранее для генов токсинов скорпионов и конусов (Kozminsky-Atias et al., 2008; Olivera et al., 1999). Было высказано предположение, что пептиды Кунитц-типа актинии *H. crisper* произошли от одного гена-предшественника и

эволюционировали вследствие тандемной дупликации генов с последующей адаптивной дивергенцией, приводящей к сохранению функциональной специализации или диверсификации, что можно наблюдать на примере пептидов APHC1–APHC3, модулирующих TRPV1 (Isaeva et al., 2012; Чаусова, 2012).

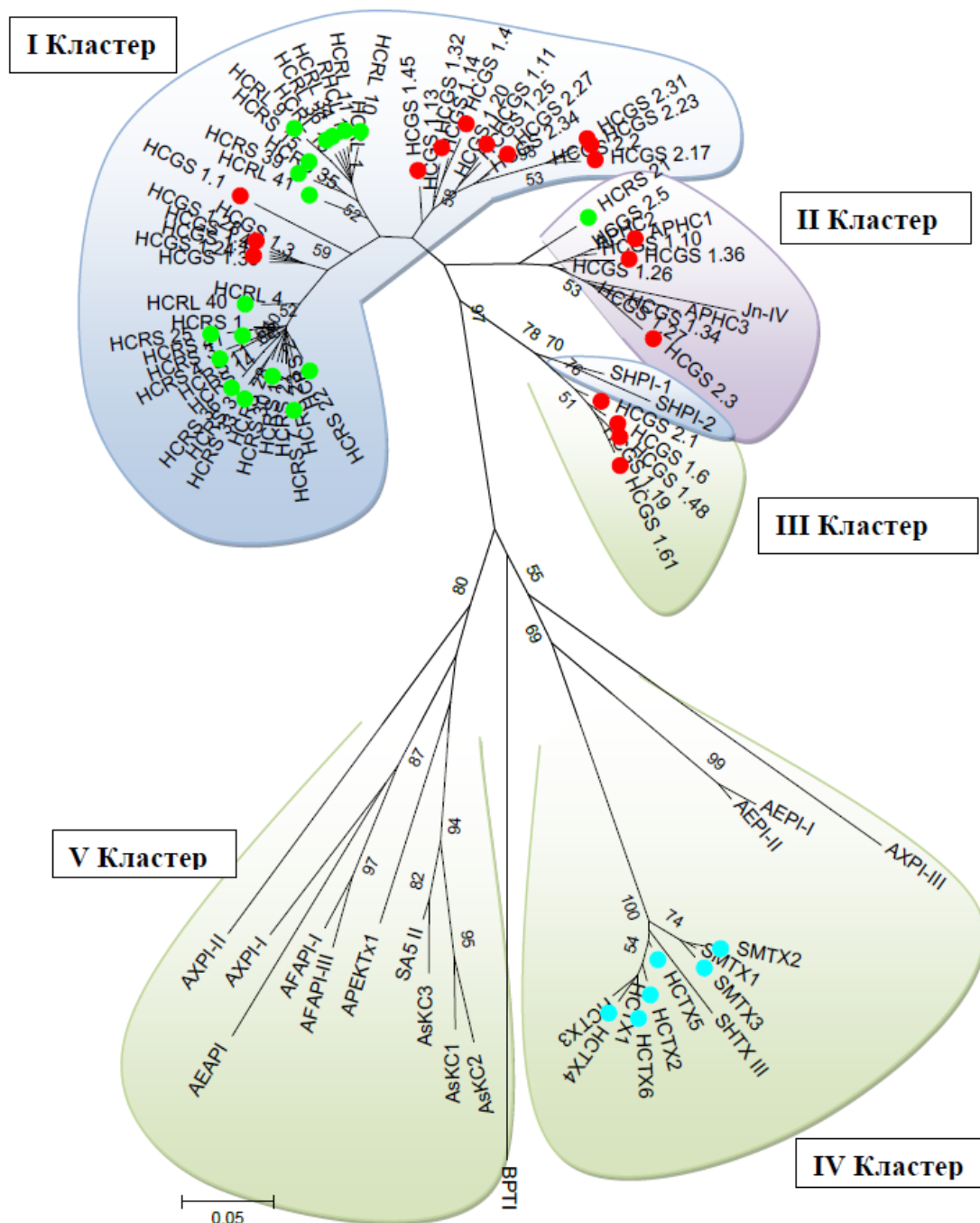


Рисунок 14 – Филогенетическое дерево пептидов Кунитц-типа актиний семейства Actiniidae и Stichodactylidae, построенное методом минимальной эволюции. HCGS-пептиды на дереве обозначены красными кругами, HCRG-пептиды – зелеными и HCTX/SMTX пептиды – голубыми. AEAPI, AEPI-I, AEPI-II из *A. equina*; AFAPI-I, AFAPI-III из *A. fuscoviridis*; AXPI-I, AXPI-II, AXPI-III из *A. xanthogrammica*; APEKTx1 из *A. elegantissima*; AsKC1–AsKC3 и SA5 II из *A. sulcata*; Jn-IV, APHC1–APHC3 из *H. crispa*; ShPI-1, ShPI-2 из *S. helianthus*; SHTXIII из *S. haddoni*. AP пептидов, имеющих в P1 положении Lys, представлены на синем фоне, Thr – на сиреновом фоне, Arg – на зеленом фоне (Чаусова, 2012).

Возникновение мультигенного семейства пептидов Кунитц-типа у тропической актинии *H. crispa* может быть обусловлено необходимостью взаимодействовать с большим числом жертв и хищников (Isaeva et al., 2012; Чаусова, 2012). Однако большинство представителей мультигенного надсемейства, обнаруженных в результате анализа транскриптов, не было выделено из яда актинии, и вопрос о реальном существовании комбинаторной библиотеки и ее размерах до сих пор остается открытым. Ожидается, что среди еще неисследованных пептидов Кунитц-типа *H. crispa* могут быть найдены новые неофункционализированные представители (модуляторы ионных каналов или рецепторов), а также расширен спектр мишеней их действия.

2 Материалы и методы

2.1 Материалы и оборудование

2.1.1 Материалы

В работе использовали полихром-1 (политетрафторэтилен) (Олайн, Латвия), N- α -бензоил-D,L-аргинин-п-нитроанилид (BAPNA), 2-хлоро-4-нитрофенил- α -D-мальтотриозу, Трис-HCl (Helicon, Россия), акарбозу, трипсин, свиную панкреатическая α -амилазу (PPA), эндопротеиназу Glu-C из *Staphylococcus aureus*, этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА) (динатриевая соль), N,N-диметилформамид (ДМФА), диметилсульфоксид (ДМСО), хлорид натрия, глицерин, 2-(N-морфолино)-этансульфоновую кислоту (MES), бромциан (BrCN), 4-винилпиридин, синапиновую кислоту, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид (МТТ), липополисахарид (ЛПС) из *Escherichia coli* серотипа 055:B5, гистамин, фексофенадин (Sigma, США); реактивы для электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ), β -меркаптоэтанол, агарозу (BioRad, США); бычий сывороточный альбумин (БСА) (Reanal, Венгрия); трифторуксусную кислоту (ТФУ) (Merck, Германия); ацетонитрил 0 сорта (Криохром, Россия); стандарты молекулярных масс Page Ruler Unstained Broad Range Protein Ladder, эндонуклеазы рестрикции *EcoRI* и *XhoI*, рабочий буферный раствор для эндонуклеаз рестрикции Tango, T4-ДНК-лигазу (Thermo Scientific, США); стандарты молекулярных масс, смесь дезоксинуклеотидов (dNTPs), Taq ДНК-полимеразу и буферный раствор для Taq-полимеразы (НПО «Сибэнзим», Россия); изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ), имидазол (Helicon, Россия); Ni²⁺-NTA агарозу (Qiagen, Нидерланды); плазмидный вектор pET-32b(+) (Novagen, США); дитиотреитол (Fluka bioChemika, Канада); олигонуклеотиды синтезированные фирмой ЗАО «Евроген» (Россия); флуоресцентные зонды Fluo-3/AM, DCFH-DA и FA-OMe, карбенициллин (Invitrogen, США); компоненты сред для культивирования *E. coli* (бакто-пептон, бакто-агар и дрожжевой экстракт) (Difco, США), состав сред указан в таблице 2; гентамицин, среду DMEM, эмбриональную бычью сыворотку (BioloT, Россия); штаммы *E. coli* XL-1 Blue (Stratagene, США) и BL21 (DE3) (Novagen, Германия); культуры клеток Neuro2a и RAW 264.7 (Американская коллекция типовых культур, США); хроматографические колонки Superdex Peptide HR 10/30 (10 × 300 мм) (GE Healthcare, США), Nucleosil C₁₈ (4,6 × 250 мм) (Sigma, США), Jupiter C₄ (10 × 250 мм) (Phenomenex, США).

Все остальные реактивы отечественного производства имели квалификацию «о.с.ч.» или «ч.д.а.», импортные реактивы имели маркировку «для молекулярной биологии» или «для аналитической работы». Все растворы были приготовлены с использованием деионизованной воды (сопротивление 18,2 МОм), полученной на установке Milli-Q system (Millipore, США).

Таблица 2 – Среды

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

2.1.2 Оборудование

В работе использовали следующее оборудование: концентратор Concentrator 5301 (Eppendorf, Германия), термостат CH-100 (BioSan, Латвия), шейкеры-инкубаторы Enviromental Shaker-Incubator ES-20 (BioSan, Латвия) и Shaker-Incubator Ecotron (INFORS HT, Швейцария), камеру для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN TetraCell (BioRad, США), камеру для горизонтального электрофореза SUB-CELL GT (BioRad, США), систему гель-документирования VersaDoc (BioRad, США), центрифуги 5810 R и miniSpin (Eppendorf, Германия), ультразвуковой дезинтегратор Sonopuls 2070 (Bandeling, Германия), спектрофотомер CE 1021 (Cecil, Великобритания), планшетный ридер xMark (BioRad, США), спектрофотометр Multiscan FC (Thermo Scientific, США), планшетный спектрофлуориметр PHERAstar FS (BMG Labtech, Германия), аналитические весы Kern AGB (Kern, Германия), амплификатор DNA Engine PTC-0200 (BioRad, США), лиофильную сушку Иней-4 (ИБП РАН, Россия), роторный испаритель Rotavapor R-200 (Büchi, Германия), хроматограф среднего давления FPLC (AKTAsistem, Pharmacia, Швеция), хроматограф Agilent 1100 (Agilent Technologies, США), электропоратор Multiporator (Eppendorf, Германия), времяпролётный масс-спектрометр Ultraflex III MALDI-TOF/TOF (Bruker, Германия), автоматический секвенатор белков Procise 492 cLC (Applied Biosystems, США), генетический анализатор ABI 3130xl (Applied Biosystems, США), спектрополяриметр Jasco-500A (Jasco, Япония).

2.1.3 Биологический материал

Для экспериментальных исследований образцы актинии *H. magnifica* были собраны в акватории Южно-Китайского моря вблизи острова Тхотю у берегов Вьетнама (09°19.3 N; 103°29.6 E) в ходе 38 научно-исследовательской экспедиции на НИС «Академик Опарин»

(2010). Видовая принадлежность образцов актиний была определена сотрудником ИБМ ДВО РАН, к.б.н. Костиной Е.Е.

2.2 Методы

2.2.2 Протеомный анализ яда актинии *H. magnifica*

2.2.2.1 Получение яда актинии *H. magnifica*

Яд актинии *H. magnifica* получали методом «доения», для этого щупальца животного массировали и собирали выделяющуюся слизь, которую фильтровали через несколько слоев ткани, а затем центрифугировали при 3000 об/мин 20 мин. Надосадочную жидкость собирали, а осадок растворяли в небольшом количестве дистиллированной воды и подвергали ультразвуковой обработке в течение 5 мин и затем центрифугировали при 12500 об/мин 30 мин. Надосадочные жидкости объединяли и лиофилизировали.

2.2.2.2 Гидрофобная хроматография

Гидрофобную хроматографию пептидов из актинии *H. magnifica* проводили на колонках (14 × 4,5 см) с полихромом-1, уравновешенным водой. Элюцию гемолизинов осуществляли водой, а ингибиторов протеиназ – 40% этанолом. Скорость элюции составляла 2 мл/мин, объем фракций – 8 мл. Детектирование осуществляли с помощью проточного спектрофотометра Uvicord 8300 (LKB, Швеция) при длине волны 280 или 214 нм. Концентрацию белка во фракциях определяли методом Лоури (Lowry et al., 1951) спектрофотометрически при 750 нм. В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин.

2.2.2.3 Гель-фильтрация

Гель-фильтрацию пептидов, элюированных при гидрофобной хроматографии 40% этанолом (гидрофобная фракция), осуществляли на высокоэффективном хроматографе среднего давления FPLC на колонке Superdex Peptide HR 10/30 (10 × 300 мм), уравновешенной 10% ацетонитрилом в 0,1% ТФУ, pH 2,2. Скорость элюции – 0,1 мл/мин. Объем фракций – 1,5 мл.

2.2.2.4 Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

ОФ ВЭЖХ ингибиторов протеиназ проводили на колонке Nucleosil C₁₈ (4,6 × 250 мм), уравновешенной 10% ацетонитрилом в 0,1% трифторуксусной кислоте, pH 2,2 на хроматографе Agilent 1100. Элюцию осуществляли в градиенте концентрации ацетонитрила

от 10 до 70% в 0,1% ТФУ, в течение 60 мин при скорости потока 0,5 мл/мин. Выход фракций определяли спектрофотометрически по поглощению при длине волны 214 нм. Для концентрирования и упаривания ацетонитрила после хроматографии использовали Concentrator 5301.

2.2.2.5 Масс-спектрометрический анализ

Масс-спектрометрический анализ пептидов проводился к.х.н. Анастюком С.Д., сотрудником лаборатории инструментальных и радиоизотопных методов анализа, на времяпролётном масс-спектрометре Ultraflex III MALDI-TOF/TOF, оборудованном азотным лазером (337 нм) с ускоряющим напряжением 25 кВ. В качестве матрицы использовали синапиновую кислоту в концентрации 10 мг/мл в соотношении ацетонитрил-вода 1:1. На подложку наносили 1 мкл матрицы, после высыхания наносили на нее 1 мкл образца пептида и высушивали потоком воздуха, после чего подложку вносили в масс-спектрометр. Времяпролетные масс-спектры фиксировали в прямом пролете и режиме рефлектора. Пептидные карты были построены при помощи программного обеспечения Origin 8.5 (Microcal Software, США).

2.2.2.6 Определение гемолитической активности

Гемолитическую активность фракций определяли на эритроцитах человека в буферном растворе следующего состава: 150 мМ NaCl, 1 мМ KCl, 10 мМ глюкоза, 5 мМ Трис-HCl, pH 7,4. Уровень гемоглобина измеряли спектрофотометрически при 540 нм после быстрого предварительного охлаждения реакционной смеси и ее центрифугирования для осаждения эритроцитов и их теней.

2.2.2.7 Определение ингибирования активности трипсина

Для определения трипсинингибирующей активности фракций к 50 мкл раствора трипсина (100 мкг/1 мл 0,001 М HCl) и 250 мкл 0,1 М Трис-HCl буферного раствора, pH 8, добавляли 50 мкл образца. После прединкубации в течение 10 мин при 37 °С добавляли 250 мкл раствора BAPNA (1 мМ). Количество образовавшегося п-нитроанилина измеряли на планшетном спектрофотометре xMark при 410 нм. Измерение проводили относительно контрольного образца, который содержал субстрат и фермент в соответствующем разбавлении.

2.2.2.8 Определение ингибирования активности панкреатической α -амилазы

Для поиска ингибиторов α -амилазы во фракциях использовали свиную панкреатическую α -амилазу (PPA). 10 мкл образца добавляли к 80 мкл 50 мМ натрий-

фосфатного буферного раствора, содержащего 100 мМ хлорида натрия (рН 7,0) и РРА (1 мкг/мл), инкубировали 10 минут при комнатной температуре и затем добавляли 2-хлор-4-нитрофенил- α -D-мальтотриозу (1 мМ) и инкубировали раствор еще 10 минут. Оптическое поглощение измеряли на планшетном спектрофотометре xMark при 405 нм. В качестве положительного контроля использовали акарбозу (1 мг/мл).

2.2.2.9 Определение токсичности на прибрежных крабах

Нейротоксичность фракций, полученных в результате гидрофобной хроматографии и гель-фильтрации, определяли на прибрежных крабах *Hemigrapsus sp.* весом 14–18 г, согласно Директиве ЕС 2010/63/EU об экспериментах на животных. Крабы были разделены на группы одинакового веса по 6 животных. Образцы в объеме 50–100 мкл (концентрация 100 мкг/кг) вводили в основание третьей ножки, физиологический раствор использовали в качестве контроля. Наблюдение за животными проводили в течение 2 ч после введения образца, а затем в течение 24 ч проверяли их жизнеспособность. Умерщвление экспериментальных животных осуществляли замораживанием при температуре минус 20 °С в соответствии с рекомендациями Американского ветеринарного общества (Leary et al., 2013).

2.2.2.10 Определение цитотоксической активности

Анализ цитотоксичности пептидов проводился к.б.н. Юрченко Е.А., сотрудницей лаборатории биоиспытаний и механизма действия биологически активных веществ ТИБОХ ДВО РАН. Клетки нейробластомы мыши Neuro2a выращивали в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки и 8 мкг/мл гентамицина. Клетки вносили в 96-луночный планшет в концентрации 1×10^5 клеток на лунку, к ним добавляли исследуемые пептиды в различных концентрациях. Затем клетки инкубировали 24 ч при 37 °С и в атмосфере 5% CO₂. После этого питательную среду заменяли на чистую бессывороточную и добавляли МТТ на 4 ч. Затем отбирали всю среду и лизировали клетки в 100% ДМСО. Оптическую плотность измеряли при 570 нм, используя Multiscan FC. Результаты получены в трех независимых экспериментах и показаны как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка.

2.2.3 Установление аминокислотной последовательности пептидов

2.2.3.1 Алкилирование пептидов

Пептиды обрабатывали 6 М гуанидингидрохлоридом в 0,5 М Трис-НСl буферном растворе, рН 8,5, содержащем 2 мМ ЭДТА. Затем добавляли 2 мкл дитиотреитола и выдерживали 4 ч при 40 °С. Тиольные группы остатков цистеина модифицировали 2 мкл

50% 4-винилпиридина в изопропанол в течение 20 мин при комнатной температуре в темноте. Реакционную смесь разделяли ОФ ВЭЖХ на колонке Nucleosil C₁₈ (4,6 × 250 мм) в градиенте концентрации ацетонитрила (10–70%) в 0,1% трифторуксусной кислоте, рН 2,2, в течение 160 мин. Скорость элюции составляла 0,5 мл/мин.

2.2.3.2 Селективный гидролиз полипептидов по остаткам глутаминовой кислоты

Очищенные алкилированные пептиды расщепляли по остаткам глутаминовой кислоты при помощи фермента эндопротеиназы Glu-C (*Staphylococcus aureus* V8-proteinase) в соотношении 20:1 (w/w) в 100 мкл 100 мМ аммоний-бикарбонатного буферного раствора (рН 8,0) при 37 °С в течение 5 ч. Полученные фрагменты были разделены ОФ ВЭЖХ на колонке Nucleosil C₁₈ (4,6 × 250 мм) в градиенте концентрации ацетонитрила (10–70%) в 0,1% трифторуксусной кислоте, рН 2,2, в течение 160 мин. Скорость элюции – 0,5 мл/мин.

2.2.3.3 Определение N-концевой аминокислотной последовательности

N-концевую аминокислотную последовательность пептидов определяли методом Эдмана на автоматическом секвенаторе белков Procise 492 cLC по программе производителя. Анализ проводил к.б.н. Черников О.В., заведующий лабораторией химии неинфекционного иммунитета ТИБОХ ДВО РАН.

2.2.4 Установление последовательностей транскриптов

Последовательности транскриптов были получены сотрудницей ЛХП ТИБОХ ДВО РАН к.х.н Чаусовой В.Е. Общую РНК выделенную из щупалец актинии *H. magnifica* с использованием набора для выделения РНК (Евроген, Россия) использовали для амплификации кДНК в соответствии с протоколом (набор для амплификации кДНК Mint RACE, Евроген, Россия). 3'-RACE проводили при следующих условиях: 95 °С в течение 2 мин; затем 30 циклов 94 °С в течение 30 с, 68 °С в течение 30 с и 72 °С в течение 1 мин; затем 72 °С в течение 7 мин; с ген-специфическими и стандартными праймерами (Таблица 3) и кДНК *H. magnifica* в качестве матрицы. Для определения последовательностей генов, кодирующих зрелые пептиды ПЦР с ген-специфическими праймерами (Таблица 3) и кДНК *H. magnifica* в качестве матрицы проводили в тех же условиях. Для клонирования полученных ПЦР-фрагментов в рTZ57R и выделения плазмид были использованы стандартные методы (описаны ниже). Нуклеотидные последовательности клонированных фрагментов определяли генетическим анализатором ABI Prism 3130xl. Анализ проводил м.н.с. Гузев К.В., сотрудник лаборатории морской биохимии ТИБОХ ДВО РАН.

2.2.5 Получение рекомбинантных пептидов

2.2.5.1 Сборка искусственных генов *hctx1*, *smtx1*, *smtx1_a49e* методом ПЦР

Нуклеотидные последовательности генов, оптимизированных для экспрессии целевых пептидов в *E. coli*, были собраны при помощи двух раундов ПЦР из праймеров (Таблица 3), сконструированных на основе природных генов *hctx1*, *smtx1*.

Таблица 3– Список праймеров, использованных в работе

Праймеры	Последовательность, 5' → 3'
Секвенирование фрагментов, клонированных в pET32b(+)	
T7 promotor	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
Секвенирование фрагментов, клонированных в pTZ57R/T	
M13 F	GTAACGACGGCCAGT
M13 R	CAGGAAACAGCTATGAC
Проведение 3'-RACE	
Inh 1	ATATGTCTAGAACCTAARGTNGTNGG
Inh 2	CCTAAGGTTGTAGGACCNTGYA
So-Mix 1	T7-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
	GTAATACGACTCACTATAGGGC
So-Mix 2	GTAATACGACTCACTATAGGGC
	AGCAGCGAACTCAGTACAACA
Клонирование зрелых HMGS-пептидов	
Ing_GS_F1	GAATTCATGGGTAGCATTTGTTTAGACC
Ing_XhoI_R	TACGGCTCGATATACGTCCTCCGCATTGAGCTA
Синтез гена <i>hctx1</i>	
HCTX1-D1	TGCCGTCTGCAGCCGGTTGCTGGTAAATGCCGTGGTACTTCCCGCGT
HCTX1-D2	TACTACTACAACCCGGAAGTTGGTAAATGCGAACAGTTCATCTACGGTG
HCTX1-D3	GTTGCGGTGGTAACAAAAACAACCTTCGAATCTTTTGAAGCTTGCCGTG
HCTX1-R1	CCGGGTTGTAGTAGTAACGCGGGAAGTAACC
HCTX1-R2	TTGTTACCACCGCAACCACCGTAGATGAACTG
HCTX1-L	GGAATTCCATGACCGAAGAACTGCCGGCTCTGTGCCGTCTGCAGCCG
HCTX1-R	TCCTCGAGTCACAGCGGGATGATGCAGGTAGCACGGCAAGCTTCGAAA
Синтез гена <i>smtx1</i>	
SMTX1-D1	TGCCGTCTGCAGCCGGTTGTTGGTAAATGCCGTGGTACTTCCCGCGT
SMTX1-D2	TACTACTACAACCCGGAAGCTGGTAAATGCGAACAGTTCATCTACGGTG
SMTX1-D3	GTTGCGGTGGTAACAAAAACAACCTTCGCTTCTTTTGAAGCTTGCCGTG
HCTX1-R1	CCGGGTTGTAGTAGTAACGCGGGAAGTAACC
HCTX1-R2	TTGTTACCACCGCAACCACCGTAGATGAACTG
HCTX1-L	GGAATTCCATGACCGAAGAACTGCCGGCTCTGTGCCGTCTGCAGCCG
HCTX1-R	TCCTCGAGTCACAGCGGGATGATGCAGGTAGCACGGCAAGCTTCGAAA
Синтез гена <i>smtx1_a49e</i>	
SMTX1-D1	TGCCGTCTGCAGCCGGTTGTTGGTAAATGCCGTGGTACTTCCCGCGT
SMTX1-D2	TACTACTACAACCCGGAAGCTGGTAAATGCGAACAGTTCATCTACGGTG
HCTX1-D3	GTTGCGGTGGTAACAAAAACAACCTTCGAATCTTTTGAAGCTTGCCGTG
HCTX1-R1	CCGGGTTGTAGTAGTAACGCGGGAAGTAACC
HCTX1-R2	TTGTTACCACCGCAACCACCGTAGATGAACTG
HCTX1-L	GGAATTCCATGACCGAAGAACTGCCGGCTCTGTGCCGTCTGCAGCCG
HCTX1-R	TCCTCGAGTCACAGCGGGATGATGCAGGTAGCACGGCAAGCTTCGAAA

Первый раунд ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 2,5 мкл 10х буферного раствора для Taq ДНК-полимеразы, 1 мкл смеси dNTPs (концентрация каждого – 10 мМ), 16,2 мкл деионизованной воды, 0,3 мкл Taq ДНК-полимеразы (5 ед./мкл), а также набор из 5 праймеров по 1 мкл 10 мМ, соответствующий НП каждого гена. Реакцию проводили на амплификаторе ptc200 (BioRad, США) при следующих условиях: 94 °С – 2 мин, затем 16 циклов: 94 °С – 20 сек, 52 °С – 20 сек, 72 °С – 30 сек, затем 72 °С – 5 мин, 10 °С – ∞.

Полученные в результате первого раунда ПЦР продукты разбавляли деионизованной водой в 20 раз и использовали в качестве ДНК-матрицы для следующего раунда ПЦР. Второй раунд ПЦР проводили в 50 мкл реакционной смеси, содержащей: 5 мкл 10х буферного раствора для Taq ДНК-полимеразы, 1 мкл смеси dNTPs (концентрация каждого 10 мМ), 1 мкл 10 мМ праймера НСТХ1-L, 1 мкл 10 мМ праймера НСТХ1-R, 1 мкл ДНК-матрицы, 40,5 мкл деионизованной воды, 0,5 мкл Taq ДНК-полимеразы (5 ед./мкл). Реакцию проводили на амплификаторе при следующих условиях: 94 °С – 2 мин, затем 25 циклов: 94 °С – 20 сек, 52 °С – 30 сек, 72 °С – 30 сек, затем 72 °С – 5 мин, 10 °С – ∞.

2.2.5.2 Электрофорез фрагментов ДНК

Анализ фрагментов ДНК проводили с помощью агарозного гель-электрофореза, используя 1% или 1,5% агарозный гель. Агарозу расплавляли в ТАЕ буфере (40 мМ Трис-ацетатный буферный раствор pH 7,6, 1мМ ЭДТА) и заливали в плашку для электрофореза со вставленной гребенкой. В качестве стандартов использовали маркеры молекулярной длины и веса ДНК 100–3000 п.н. Электрофорез проводили при напряжении 80 V. Агарозный гель окрашивали бромистым этидием (1 мкг/мл). Визуализацию образцов проводили при помощи УФ-трансиллюминатора и системы гель-документирования VersaDoc.

2.2.5.3 Получение экспрессионных конструкций на основе вектора pET-32b(+)

Рестрикцию фрагментов ДНК, полученных в результате сборки искусственных генов *hctx1*, *smtx1*, *smtx1_a49e*, и плазмидного вектора pET-32b(+) по сайтам *EcoRI* и *XhoI* проводили отдельно при 37 °С в течение 16 ч. Состав 50 мкл реакционной смеси был следующим: 1 мкл *EcoRI* (10 ед./мкл), 1 мкл *XhoI* (20 ед./мкл), 10 мкл 10х буферного раствора Tango, 23 мкл деионизованной воды и 750 нг фрагментов ДНК или 500 нг вектора pET-32b(+). Затем полученные фрагменты выделяли из реакционной смеси с помощью набора Cleanup Standard (Evrogen, Россия) согласно инструкции производителя. Лигирование ПЦР-фрагментов в плазмидный вектор pET-32b(+) проводили в реакционной смеси объёмом

10 мкл: 1 мкл вектора (31 нг/мкл), 1 мкл вставки (3 нг/мкл), 1 мкл 10х буферного раствора для T4 DNA Ligase, 0,2 мкл T4 DNA Ligase (5 ед./мкл), 6,8 мкл деионизованной воды. Реакцию лигирования проводили при 14 °С в течение 16–18 ч, инактивацию лигазы – в течение 20 мин при 80 °С.

Затем к 40 мкл электрокомпетентных клеток *E. coli* штамма XL1-blue, размороженных при 4 °С, добавляли по 1 мкл лигазной смеси. Клетки переносили в кювету и проводили электропорацию при напряжении 1700 В (5 мсек). После электропорации к клеткам добавляли 1 мл среды LB, инкубировали при 37 °С 50 мин и затем рассеивали шпателем на чашки Петри со средой LB-агар, содержащей карбенициллин (100 мкг/мл). Чашки инкубировали при 37 °С в течение 16–18 ч.

2.2.5.4 Отбор колоний, содержащих экспрессионные конструкции

Колонии *E. coli* штамма XL1-Blue (трансформированные продуктами лигирования) тестировали на наличие плазмидного вектора с корректной вставкой с помощью ПЦР. Реакционную смесь для проведения ПЦР готовили из расчета 10 мкл на каждую колонию. Состав реакционной смеси был следующим: 1 мкл 10х буферного раствора для Taq ДНК-полимеразы, 1 мкл смеси dNTPs (концентрация каждого – 10 мМ), 1 мкл 10 мкМ праймера T7 promotor, 1 мкл 10 мкМ праймера T7 terminator, 0,2 мкл Taq ДНК-полимеразы (5 ед./мкл), 11,6 мкл деионизованной воды.

В качестве ДНК-матрицы использовали тотальную нуклеиновую кислоту из клеток отдельной колонии. При этом клетки из этой же колонии переносили на новую чашку Петри со средой LB-агар, содержащей карбенициллин (100 мкг/мл), и инкубировали при 37 °С в течение 18 ч. В качестве отрицательного контроля использовали аликвоту премикса. Реакцию проводили на амплификаторе при следующих условиях: 94 °С – 5 мин, затем 25 циклов: 94 °С – 20 сек, 55 °С – 20 сек, 72 °С – 20 сек, затем 72 °С – 5 мин, 10 °С – ∞. Результаты визуализировали при помощи электрофореза в 1,5% агарозном геле. Для дальнейшего выделения рекомбинантных плазмид отбирали лишь те колонии, на матрице тотальной нуклеиновой кислоты которых амплифицировались фрагменты соответствующей длины. Отобранные колонии после инкубации на LB-агар переносили в 5 мл жидкой среды LB с добавлением карбенициллина (100 мкг/мл). Клетки инкубировали при интенсивной аэрации (180 об/мин) в течение 18 ч при 37 °С.

2.2.5.5 Выделение плазмидной ДНК

Плазмидную ДНК из клеток выделяли при помощи набора Plasmid Miniprep (Evrogen, Россия) по методике, рекомендованной производителем. Количество и чистоту плазмид анализировали при помощи электрофореза в 1% агарозном геле.

2.2.5.6 Секвенирование ДНК

Секвенирование рекомбинантных плазмид проводилось м.н.с. Гузовым К.В., сотрудником лаборатории морской биохимии ТИБОХ ДВО РАН, с использованием стандартных T7 праймеров (Таблица 3) для вектора pET-32b(+) по методу Сэнгера на генетическом анализаторе ABI 3130xl по программе производителя.

2.2.5.7 Анализ последовательностей

Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с помощью программ Vector NTI Advance 11 (Invitrogen, США) и MEGA 7 (Kumar et al., 2016). Поиск гомологичных последовательностей проводили с помощью сервера BLAST (<http://www.uniprot.org/blast/>).

2.2.5.8 Гетерологичная экспрессия

Трансформированные клетки *E. coli* штамма BL21(DE3) наращивали в среде LB с добавлением карбенициллина (100 мкг/мл) в объеме 1 л до достижения оптической плотности $A_{600} = 0,6–0,8$. Экспрессию индуцировали добавлением индуктора ИПТГ в конечной концентрации 0,2 мМ и продолжали наращивание клеток в течение 16–18 ч при температуре 18 °С для получения гибридного белка в растворимой форме. Затем клетки осаждали центрифугированием (8000 об/мин в течение 8 мин).

2.2.5.9 Электрофорез белков в полиакриламидном геле

Денатурирующий электрофорез клеточных лизатов *E. coli* выполняли в вертикальных пластинах (9 × 12 × 0,1 см) с 15% полиакриламидным гелем в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия с лунками объемом 15 мкл на приборе Mini-PROTEAN. В качестве стандартов использовали Page Ruler Unstained Broad Range Protein Ladder. Электрофорез проводили в буферном растворе, содержащем 25 мМ Трис-НСl (рН 8,3), 250 мМ глицин и 0,1% додецилсульфат натрия. Перед нанесением в лунки к образцам добавляли буферный раствор (20% SDS, 50% глицерин, 4% 2-меркаптоэтанол, 0,5 М ЭДТА, 0,5 М Трис-НСl (рН 6,8) и 0,1% (w/v) бромфеноловый синий) в соотношении 1:1 (v/v) и прогревали при температуре 100 °С в течение 15 мин. Окрашивание гелей проводили в течение часа в

растворе 0,5% Кумасси R-250, 10% уксусной кислоты, 30% изопропанола. Отмывку от избытка красителя проводили в нескольких сменах раствора 10% уксусной кислоты.

2.2.5.10 Выделение гибридного рекомбинантного белка методом металл-аффинной хроматографии

Клетки, содержавшие гибридный белок, ресуспендировали в 30 мл буферного раствора (0,02 М Трис-НCl, pH 7,5–8, 0,4 М NaCl, 1% глицерин), обрабатывали ультразвуком на приборе HD 2070 для разрушения клеточной оболочки. После центрифугирования (10000 об/мин) клеточный лизат наносили на колонку с Ni^{2+} -NTA агарозой. Для удаления белков клеточного лизата Ni^{2+} -NTA агарозу с гибридным белком промывали буферным раствором (0,02 М Трис-НCl, pH 7,5–8, 0,4 М NaCl, 10 мМ имидазол). Фракцию, содержащую рекомбинантный пептид, смывали элюирующим раствором (0,02 М Трис-НCl, pH 7,5–8, 0,4 М NaCl, 250 мМ имидазол). После окончания работы колонку с носителем промывали раствором 20 мМ MES и затем водой.

2.2.5.11 Измерение концентрации по спектру поглощения

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

2.2.5.12 Гидролиз гибридного рекомбинантного белка

Гидролиз проводили по модифицированной методике (Andreev et al., 2010). Раствор, содержащий рекомбинантный пептид, разбавляли до концентрации 1 мг/мл, затем добавляли HCl и BrCN до конечной концентрации 0,2 М и 0,025 М соответственно. Реакционную смесь инкубировали 16–18 ч при комнатной температуре в темноте, затем упаривали на вакуумном концентраторе Concentrator 5301, чтобы избавиться от BrCN. Выделение целевого пептида из реакционной смеси проводили ОФ ВЭЖХ на колонке Jupiter C₄ (10 × 250 мм) в линейном градиенте концентрации ацетонитрила от 0 до 70% в 0,1% ТФУ при pH 2,2, в течение 70 мин при скорости потока 3 мл/мин.

2.2.5.13 Спектры кругового дихроизма

Спектры кругового дихроизма (КД) были получены н.с. Ким Н.Ю., сотрудницей группы оптической молекулярной спектроскопии ТИБОХ ДВО РАН. Спектры КД регистрировали на спектрополяриметре Jasco-500A в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 0,1 см для пептидной области спектра (190–240 нм) и 1 см для ароматической области (230–310 нм). Кювету с раствором ингибитора в концентрации 0,05 мг/мл в 0,01 М натрий-фосфатном буферном растворе термостатировали при заданной температуре в течение 20–25 мин до снятия спектра КД. Содержание элементов вторичной структуры белка рассчитывали методом Провенчера–Глокнера (Provencher and Glöckner, 1981), используя усовершенствованные программы расчета из пакета программ CD Pro (Sreerama and Woody, 2000).

2.2.6 Установление биологической активности индивидуальных пептидов

2.2.6.1 Определение константы ингибирования трипсина

Определение константы ингибирования трипсина нативных и рекомбинантных пептидов проводили по методу Диксона (Dixon, 1953) спектрофотометрически в 96 луночном планшете. Реакционные смеси, содержащие 150 мкл буферного раствора 50 мМ Трис-HCl буфере, pH 8,0, трипсина в концентрации 200 нМ, а также исследуемого пептида в различных концентрациях инкубировали в течение 10 мин при 37 °C. Далее вносили по 50 мкл раствора субстрата в 50 мМ Трис-HCl буфере, pH 8,0, содержащем 10% ДМСО. В качестве субстрата использовали BAPNA в концентрациях 0,6 и 1,2 мМ. Количество образовавшегося п-нитроанилина определяли через 30 мин инкубации при 37 °C измерением оптического поглощения при 410 нм на планшетном спектрофотометре xMark. Константы ингибирования рассчитывали по данным трех параллельных экспериментов.

2.2.6.2 Определение острой токсичности

Тестирование острой токсичности проводилось в сотрудничестве с группой изучения биологически активных добавок ТИБОХ ДВО РАН. В исследовании действия пептидов *in vivo* использовали мышей линии CD-1 (виварий ТИБОХ ДВО РАН) весом 20 ± 1 г. Работы с животными проводили в строгом соответствии с законодательством Российской Федерации и положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей». Животных содержали при температуре 23 ± 2 °C, вода и еда *ad libitum*. Каждое животное использовали для эксперимента один раз.

Тестируемые пептиды растворяли в 100 мкл физиологического раствора (0,9% NaCl) и вводили экспериментальным животным внутривентрально. Затем наблюдали за поведением животных в течение 6 ч, а также проверяли их состояние спустя 24 ч. Контрольным животным внутривентрально вводили 100 мкл физиологического раствора.

2.2.6.3 Электрофизиологические исследования

Электрофизиологические исследования проводились докторами Титгатом Я. и Пеньером С., сотрудниками лаборатории токсикологии Университета г. Левен, Бельгия. Для экспрессии различных изоформ K_v ($gK_v1.1$, $gK_v1.2$, $hK_v1.3$, $gK_v1.4$, $gK_v1.5$ и $gK_v1.6$, где g – канал крысы, h – канал человека), а также рецептора TRPV1 в ооцитах *Xenopus laevis* соответствующие гены клонировали в плазмиду pSP64T. Далее плазмиды линеаризовали по сайтам рестрикции и кэпированные мРНК синтезировали с помощью системы для транскрипции mMESSAGE mMACHINE T7. Раствор РНК (50 нл с концентрацией 1 нг/нл) вводили в ооциты с помощью микроинжектора Nanoject II, затем клетки инкубировали 2–4 дня в буферном растворе ND96 (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7,4). Эксперименты по установлению физиологической активности соединений на ооцитах, экспрессирующих каналные белки, проводили методом двухэлектродной фиксации потенциала на электрофизиологической установке Genesclamp 500. Все измерения проводили при комнатной температуре (18–22 °C) как описано (Gladkikh et al., 2012; Monastyrnaya et al., 2016). Обработку полученных результатов проводили с помощью программы Origin 8.5 (Microcal Software, США).

2.2.6.4 Определение антигистаминной активности

Определение антигистаминной активности проводилось к.б.н. Пислягиным Е.А. и к.б.н. Менчинской Е.С., сотрудниками лаборатории биоиспытаний и механизма действия биологически активных веществ ТИБОХ ДВО РАН. Внутриклеточное содержание ионов Ca^{2+} в макрофагах костного мозга мыши измеряли стандартным методом. Культуру макрофагов костного мозга промывали раствором фосфатно-солевого буфера (ФСБР), pH 7,4, клетки смывали интенсивным пипетированием и вносили в лунки 96-луночного планшета в количестве 5×10^3 кл/лунку. Клетки выдерживали 2 ч для прикрепления, промывали раствором Хэнкса и добавляли по 100 мкл/лунку раствора флуоресцентного кальций-чувствительного зонда Fluo-3/AM (5 мкМ) в буферном растворе следующего состава: 145 mM NaCl, 10 mM глюкоза, 5 mM KCl, 0,8 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7,4, и далее инкубировали при 37 °C в течение 40 мин. Затем клеточный монослой трижды промывали той же средой, добавляли по 100 мкл среды и выдерживали клетки при

комнатной температуре еще 30 мин. Измерение базовой флуоресценции проводили в течение 2 мин. Затем в лунки вносили по 20 мкл раствора гистамина (50 мкМ) и регистрировали изменение интенсивности флуоресценции в течение 1–3 мин. Для исследования блокирующего действия пептидов или фексофенадина (10 мкМ) клетки, нагруженные флуоресцентным зондом, предварительно инкубировали в течение 30 мин в присутствии исследуемых соединений. Измерение интенсивности флуоресценции проводили при $\lambda_{ex} / \lambda_{em} = 485 \text{ нм} / 520 \text{ нм}$ с помощью флуоресцентного планшетного спектрофлуориметра PHERAstar FS. За 100% принимали максимальную интенсивность флуоресценции контрольных клеток в присутствии гистамина. Результаты получены в трех независимых экспериментах и показаны как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка.

2.2.6.5 Определение содержания внутриклеточного оксида азота II (NO)

Определение содержания внутриклеточного NO проводилось к.б.н. Пислягиным Е.А., сотрудником лаборатории биоиспытаний и механизма действия биологически активных веществ ТИБОХ ДВО РАН. Клетки линии RAW 264.7 культивировали в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, в атмосфере 5% CO₂ при 37 °С. За 2–3 ч до начала эксперимента клетки помещали в 96-луночные планшеты в количестве 5×10^3 кл/лунку. По достижении полной адгезии к клеткам добавляли растворы пептидов и/или ЛПС (0,5 мкг/мл) и инкубировали в течение 24 ч. Для определения уровня эндогенно синтезируемого NO к клеткам добавляли флуоресцентный NO-чувствительный зонд FA-OMe в концентрации 10 мкМ в течение 8 ч. Перед измерением интенсивности флуоресценции клеточный монослой промывали ФСБР, pH 7,4, и регистрировали флуоресценцию при $\lambda_{ex} / \lambda_{em} = 485 \text{ нм} / 520 \text{ нм}$ с помощью планшетного спектрофлуориметра PHERAstar FS. За 100% принимали максимальную интенсивность флуоресценции клеток в присутствии ЛПС. Результаты получены в трех независимых экспериментах и показаны как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка.

2.2.6.6 Определение содержания активных форм кислорода (АФК)

Определение содержания АФК проводилось к.б.н. Пислягиным Е.А., сотрудником лаборатории биоиспытаний и механизма действия биологически активных веществ ТИБОХ ДВО РАН. Клетки линии RAW 264.7 культивировали в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, в атмосфере 5% CO₂ при 37 °С. За 2–3 ч до начала эксперимента клетки помещали в 96-луночные планшеты в количестве 5×10^3 кл/лунку. По достижении полной адгезии к клеткам добавляли растворы пептидов и/или ЛПС (0,5 мкг/мл)

и инкубировали в течение 24 ч. Для определения уровня эндогенно синтезируемого NO к клеткам добавляли флуоресцентный АФК-чувствительный зонд DCFH-DA в концентрации 10 мкМ в течение 30 мин в темноте. Перед измерением интенсивности флуоресценции клеточный монослой промывали раствором ФСБР, рН 7,4, и регистрировали флуоресценцию при $\lambda_{ex} / \lambda_{em} = 485 \text{ нм} / 520 \text{ нм}$ с помощью планшетного спектрофлуориметра PHERAstar FS. За 100% принимали максимальную интенсивность флуоресценции клеток в присутствии ЛПС. Результаты получены в трех независимых экспериментах и показаны как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка.

2.2.6.7 Определение содержания про ИЛ-1 β

Определение уровня про ИЛ-1 β было выполнено доктором Хуа К.-Ф., сотрудником отделения биотехнологии и животноводства университета г. Илань, Тайвань. Макрофаги J774A.1 высевали на культуральную чашку в количестве 2×10^6 кл/мл культуральной среды на 24 ч. Клетки инкубировали 30 мин с исследуемыми пептидами и без них, затем добавляли ЛПС (1мкг/мл) и инкубировали их еще 6 ч. Уровень ИЛ-1 β в культуральной среде оценивался методом Вестерн-блоттинга как описано в статье (Gladkikh et al., 2015).

2.2.6.8 Определение содержания ФНО- α и ИЛ-6

Данное исследование было выполнено доктором Хуа К.-Ф., сотрудником отделения биотехнологии и животноводства университета г. Илань, Тайвань. Макрофаги RAW 264.7 высевали в 24-луночные планшеты в количестве $0,5 \times 10^5$ кл/мл культуральной среды и оставляли на 24 ч. Клетки инкубировали 30 мин с исследуемыми пептидами и без них, затем добавляли ЛПС (1мкг/мл) и инкубировали их еще 24 ч. Количество ФНО- α и ИЛ-6 в среде оценивали методом иммуноферментного анализа (ELISA) как описано в статье (Gladkikh et al., 2015).

3 Результаты исследования и их обсуждение

3.1 Протеомный анализ ядовитого секрета актинии *H. magnifica*

3.1.1 Получение нейротоксической фракции ядовитого секрета

Актиния *H. magnifica* широко распространена в водах Тихого и Индийского океанов. Ранее было показано, что ее ядовитый секрет обладает противоопухолевой активностью (Ramezanpour et al., 2013, 2012), а из водно-этанольного экстракта цельного организма было выделено и охарактеризовано несколько токсинов: блокатор калиевых каналов HmK (Gendeh et al., 1997), модуляторы натриевых каналов RpII и RpIII (Metrione et al., 1987; Schweitz et al., 1985) и α -пороформирующие токсины HMgs (Khoo et al., 1993; Wang et al., 2008, 2000). Однако публикации о пептидах Кунитц-типа отсутствовали, а состав ядовитого секрета оставался мало изученным, поэтому в данной работе, впервые проведен его протеомный анализ (Sintsova et al., 2018). Ядовитый секрет *H. magnifica*, полученный нами в результате механической стимуляции щупалец, проявлял высокую нейротоксическую, гемолитическую и цитотоксическую активности, а также ингибировал трипсин и свиную панкреатическую α -амилазу (PPA). Так как большинство нейротоксинов и ингибиторов является гидрофобными молекулами, а α -пороформирующие токсины – гидрофильными, на первом этапе их разделения была применена гидрофобная хроматография на полихrome-1 (Рисунок 15 А).

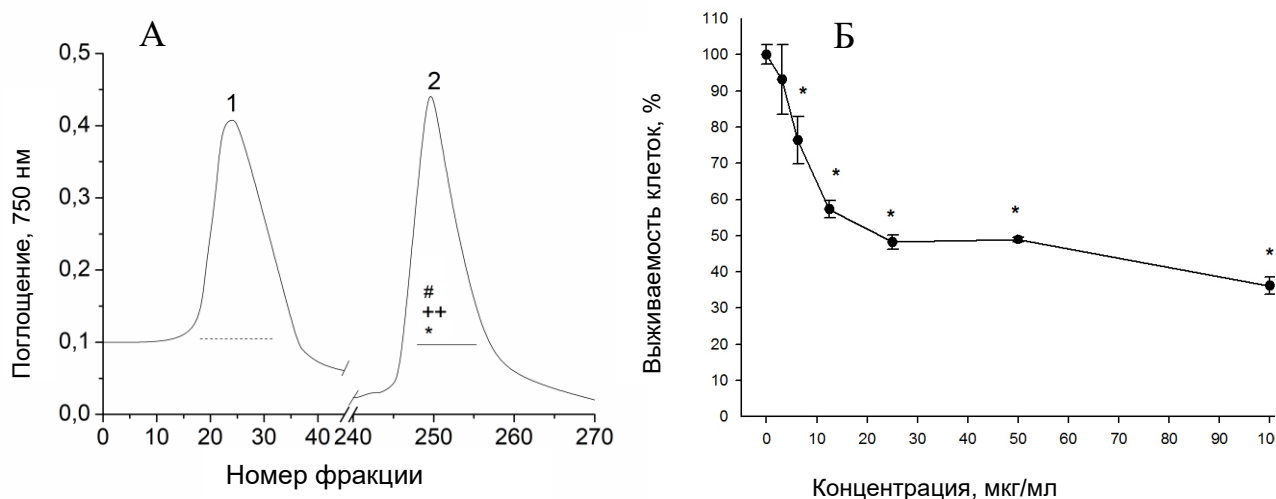


Рисунок 15 – (А) Гидрофобная хроматография пептидов ядовитого секрета *H. magnifica*. Пик 1 – элюция водой, пик 2 – элюция 40% этанолом. Отмечены границы объединения фракций с гемолитической (пик 1, пунктирная линия) и трипсинингибирующей (пик 2, сплошная линия) активностью. Ингибирование PPA – (*), нейротоксичность – (+), цитотоксичность – (#). (Б) Цитотоксическая активность гидрофобной фракции на клетках Neuro2a. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (n=4). *p < 0,05.

Пептиды фракции, элюированные водой, обладали гемолитической активностью. Пептиды фракции, элюированные 40% этанолом, проявляли высокую трипсинингибирующую и РРА-ингибирующую активности. Помимо этого, они были токсичны для клеток мышинной нейробластомы Neuro2a ($ЭД_{50} = 24,5 \pm 5,5$ мг/мл) (Рисунок 15 Б), а при введении крабам вызывали судороги и паралич, за которыми следовала смерть. Так как α -пороформирующие токсины *H. magnifica* изучены достаточно полно (Khoo et al., 1993; Wang et al., 2008, 2000), для дальнейшего исследования использовали только нейротоксическую фракцию. На втором этапе разделения пептидов была проведена гель-фильтрация на колонке Superdex Peptide 10/30. В результате хроматографического разделения было получено 5 фракций (Рисунок 16 А). Фракции 2 и 3 обладали высокой трипсинингибирующей активностью, активность фракции 4 была слабее. Фракции 3 и 4 обладали высокой РРА-ингибирующей активностью. Фракции 4 и 5 были токсичны для клеток нейробластомы Neuro2a, однако уменьшение жизнеспособности клеток составляло лишь 7–20% (Рисунок 16 Б, В), что было ниже 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* (Chaousis et al., 2014). Пептиды фракций 3 и 4 оказались токсичны для крабов – введение фракции 3 приводило к гибели животных, фракции 4 – вызывало их паралич.

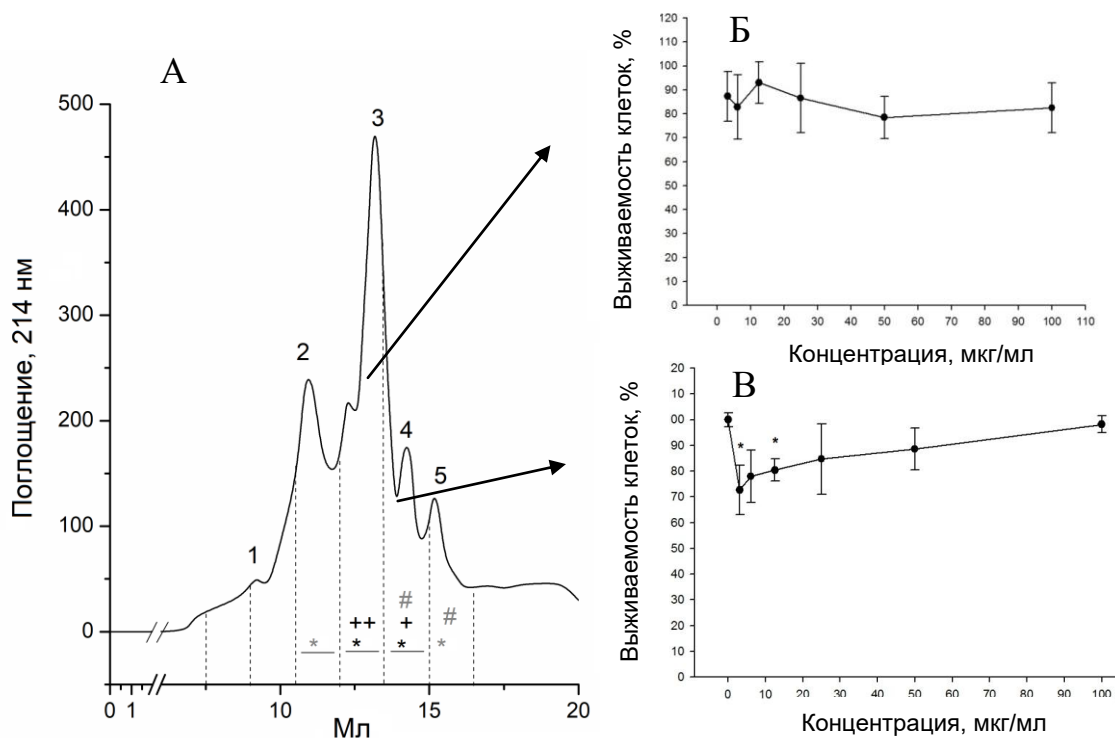


Рисунок 16 – (А) Гель-фильтрация пептидов гидрофобной фракции на колонке Superdex Peptide 10/30. Отмечены границы объединения активных фракций. Трипсинингибирующая активность показана сплошной линией, ингибирование РРА – (*), токсичность на крабах – (+), цитотоксичность – (#). Цитотоксичность фракций 4 (Б) и 5 (В) на клетках Neuro2a. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение ($n=4$), $*p < 0,05$.

3.1.2 Конструирование пептидных карт

Для характеристики компонентов ядов различных животных широко используют современные хроматографические и масс-спектрометрические методы (Cassoli et al., 2013; Lomonte and Calvete, 2017; Rodríguez et al., 2012; Zaharenko et al., 2008). 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 определить разнообразие изоформ пептидов, отличающихся точечными заменами аминокислотных остатков в последовательностях (Lomonte and Calvete, 2017). Для конструирования пептидных карт была проведена ОФ ВЭЖХ пептидов фракций, полученных гель-фильтрацией, и их масс-спектрометрический анализ (Рисунок 17). Данный подход использовали ранее другие научные группы при исследовании ядов актиний *B. granulifera*, *B. cangicum*, *S. helianthus* и *S. duerdeni* (Cassoli et al., 2013; Rodríguez et al., 2012; Zaharenko et al., 2008).

В результате разделения пептидов фракции 2 (Рисунок 16 А) было получено 13 фракций, обозначенных 1а–13а (Рисунок 17 А, Б), время удерживания пептидов этих фракций находилось в диапазоне 30–40 мин, что соответствовало 30–40% CH_3CN в элюирующем растворе. С помощью МС анализа было обнаружено 39 пептидов с молекулярной массой от 4528 до 21701 Да. Наиболее часто встречались пептиды с массой 6000 и 7000 Да, которые соответствуют массам пептидов Кунитц-типа (García-Fernández et al., 2016; Gladkikh et al., 2015; Honma et al., 2008; Isaeva et al., 2012). Все полученные фракции ингибировали трипсин (Рисунок 17 А, Таблица 4).

При разделении пептидов фракции 3 (Рисунок 16 А) был получен более сложный профиль элюции, насчитывающий 22 фракции (16–22б) (Рисунок 17 В, Г), в диапазоне времен удерживания 25–45 мин (25–45% CH_3CN). Было обнаружено 106 пептидов с молекулярной массой от 2461 до 11400 Да. Наиболее часто встречались пептиды с массой 3000–4000 Да, 5000–6500 Да и 8000–9000 Да, которые являются типичными для модуляторов ионных каналов (Na_v , K_v , ASICs, TRPV1), пептидов Кунитц-типа и ингибиторов α -амилазы (Diochot et al., 2004; Kem et al., 1989; Schweitz et al., 1995, 1985; Tysoe et al., 2016; Yamaguchi et al., 2010; Zykova et al., 1988). Было установлено, что девять фракций проявляет трипсинингибирующую активность (9б–16б и 19б), пять фракций (10б–14б) – РРА-ингибирующую (Рисунок 17 В, Таблица 5).

В результате ОФ ВЭЖХ пептидов фракции 4 (Рисунок 16 А) было получено 18 фракций (1в–18в), содержащих 181 пептид, с временами удерживания в диапазоне 25–52

минут (25–52% CH_3CN) (Рисунок 17 Д, Е). Молекулярные массы пептидов составляли от 2591 до 13659 Да с наибольшей частотой 2000–4000 Да. Пять фракций (7в–10в и 12в) также проявляло трипсинингибирующую активность, но количество пептидов с молекулярными массами около 6000 Да было значительно меньшим, чем во фракциях 2 и 3. Одиннадцать фракций обладало РРА-ингибирующей активностью (7в–14в) (Рисунок 17 Д, Таблица 6).

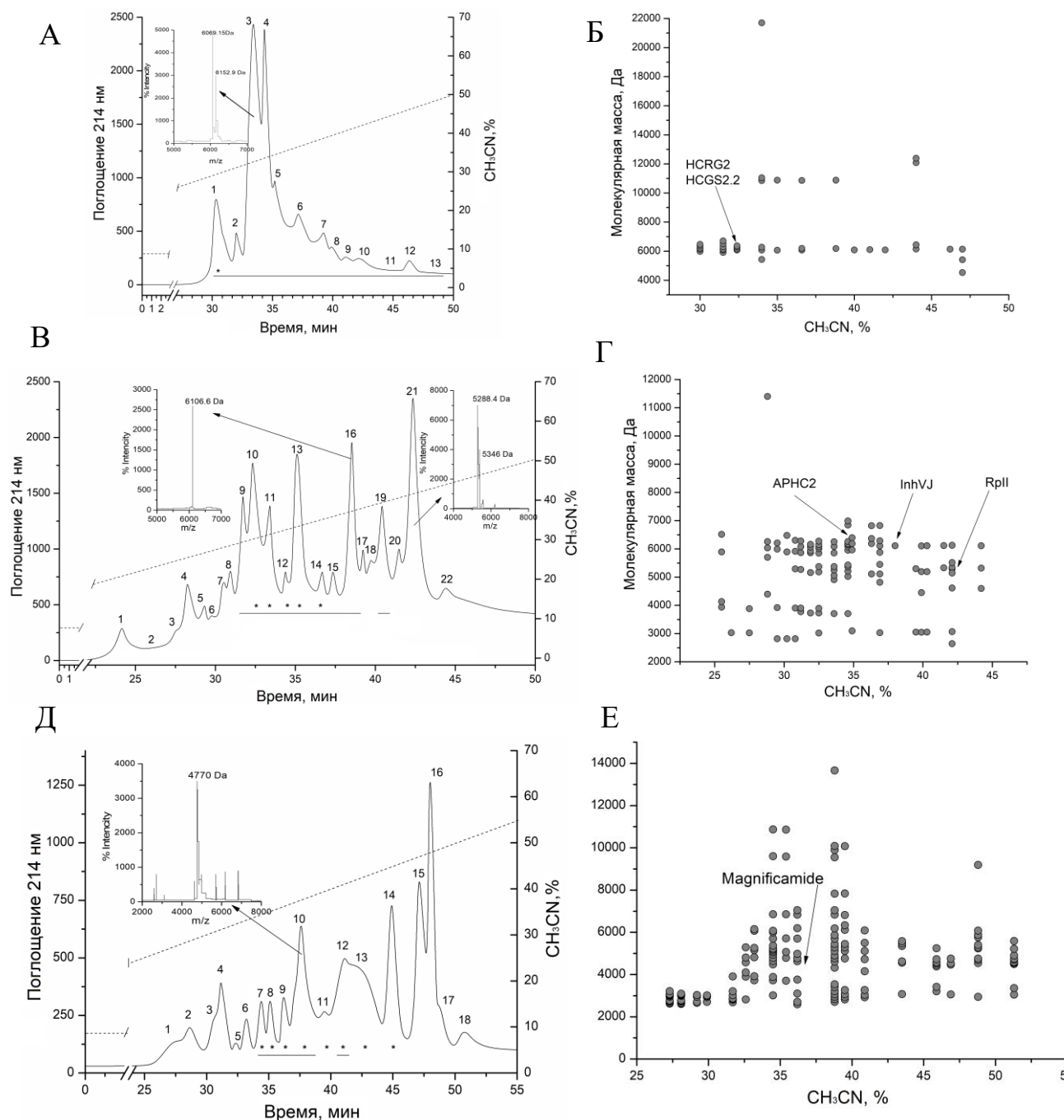


Рисунок 17 – Профили элюции ОФ ВЭЖХ пептидов на колонке Nucleosil C18 и пептидные карты, соответствующие фракциям, полученным в результате гель-фильтрации 2 (А, Б), 3 (В, Г) и 4 (Д, Е). Фракции с трипсинингибирующей активностью показаны сплошной линией, ингибирующие РРА – (*).

Таблица 4 – Молекулярные массы и гидрофобность пептидов фракции 2

Фракция	% CH ₃ CN	Трипсин- ингибирующая активность	PPA- ингибирующая активность	Молекулярная масса [M+H] ⁺
1a	30	++	+	5982, 6135, 6210, 6363, 6471
2a	31,5	++		5911, 6081, 6136, 6295 , 6500, 6705,
3a	32,4	++		6069, 6152 , 6279, 6360,
4a	34	++		5428, 6074, 6266, 10849, 11048 , 21701,
5a	35	++		6063 , 10827
6a	36,6	++		6072, 6188 , 10856
7a	38,8	++		6179 , 10882
8a	40	++		6084
9a	41	++		6105
10a	42	+		6088
11a	44	+		6149, 6432 , 12081, 12387
12a	46,2	+		6138
13a	47	+		4528, 5407, 6131

Таблица 5 – Молекулярные массы и гидрофобность пептидов фракции 3

Фракция	% CH ₃ CN	Трипсин- ингибирующая активность	PPA- ингибирующая активность	Молекулярная масса [M+H] ⁺
16	25,5			3936, 4130, 5888, 6513
26	26,2			3028
36	27,5			3020, 3880
46	28,8			4343, 5697, 6033, 6256, 11400
56	29,5			2813 , 3919, 5989, 6209
66	30,2			2813, 5888 , 6474
76	30,8			2813, 3903 , 5286, 5912, 6298
86	31,2			3771, 3900, 5265 , 5863, 6078, 6276
96	31,9	++		3728 , 5156, 5857, 5929, 6086, 6157
106	32,5	++	++	3015, 3725, 3891, 5179, 5371, 5844, 6005, 6077, 6146, 6272
116	33,6	++	++	3705 , 4909, 5061, 5246 , 5369, 5854, 6082 , 6252
126	34,6	++	+	3706, 5020, 5207 , 5363, 5428, 5953, 6078, 6147, 6181 , 6257, 6841, 6989
136	34,9	++	+	3092, 5960, 6186 , 6391
146	36,3	++	+	5109, 6185, 6366, 6822
156	36,9	++		3026, 4816, 5107, 5447, 5875, 6103 , 6282, 6827
166	38	++		6106
176	39,5			3047 , 5293
186	39,9			3044 , 4446, 5190, 6105
196	40,3	+		3046 , 5193, 6109
206	41,5			5330 , 6112
216	42,1			2641, 3047, 4616, 5152, 5288, 5346 , 5512, 6152
226	44,2			4593 , 5317, 6108

Таблица 6 – Молекулярные массы и гидрофобность пептидов фракции 4

Фракция	% CH ₃ CN	Трипсин- ингибирующая активность	РРА- ингибирующая активность	Молекулярная масса [M+H] ⁺
1в	27,3			2624, 2640, 2663, 2724, 2739 , 2762, 2776, 2947, 2994, 3011 , 3032, 3049, 3071, 3216
2в	28,1			2609, 2630, 2649, 2721, 2745, 2763, 2783, 2997, 3017, 3026 , 3057, 3073, 3091
3в	29,2			2662, 2701, 2950, 3033
4в	29,9			2703, 2930, 2976, 2989 , 3012
5в	31,7			2687, 2811, 2833, 2850 , 2870, 3017, 3201, 3909
6в	32,6			2815, 3901 , 4099, 4578, 4806, 5288
7в	33,2	+	++	3721 , 3919, 4815, 5153, 5263, 6073, 6152
8в	34,5	++	+	3016, 3725, 3880 , 4482, 4648, 4788 , 4935, 5044, 5116, 5185 , 5230, 5368, 5701, 6002, 6073, 6849, 9601, 1086
9в	35,4	+	+	3709, 4783 , 5066, 5709, 6848, 9582, 10857
10в	36,2	+	++	2591, 2707, 3101, 3761, 4631, 4770 , 4978, 5705, 6188, 6833 , 7046
11в	38,8		++	2704, 2833, 2947, 3061 , 3202, 3409, 3543, 4325, 4613, 4767, 4900, 5114, 5286, 5445, 5692, 5869, 6186, 6832 , 7045, 7823, 9554, 9892, 10083, 13659
12в	39,5	++	++	2818, 2932, 3062 , 3268, 4761, 5112, 5292, 5449, 6112 , 6333, 6817, 7839, 10076
13в	40,9		+	2927, 3042 , 3267, 4149, 4722, 5105, 5496, 6088
14в	43,5		+	3061 , 4559, 4618, 5346 , 5469, 5576, 3203, 3418, 4382, 4446, 4538, 4579 , 4722, 5247
15в	45,9			3057, 4474, 4522 , 4747
16в	46,9			2939, 4542, 4602 , 4754, 5233, 5289, 5405, 5760, 5873 , 6076, 9189
17в	48,8			3046, 3358, 4493, 4542, 4579 , 4596, 4719, 4746, 4904, 5215, 5585
18в	51,3			

Молекулярные массы, соответствующие наиболее интенсивным масс-спектрометрическим пикам, выделены жирным шрифтом, выбранные для установления АП – подчеркнуты.

Всего было обнаружено 326 пептидов, исходя из времен удерживания и значений молекулярных масс. На основе данных МС анализа была проведена предварительная идентификация некоторых пептидов. Так, фракция 21б содержала пептид с молекулярной массой 5288 Да, идентичной массе модулятора Na_v, токсина RpII (5288 Да) (Schweitz et al., 1985) (Рисунок 17 В, Г). Фракция 10в 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)

(Рисунок 17 Д, Е). В результате повторной хроматографии пептидов фракции 10в был получен высокоочищенный пептид, обладающий РРА-ингибирующей активностью.

В ходе анализа идентифицировано несколько пептидов Кунитц-типа, идентичных таковым актинии *H. crispa*. Так, во фракции 3а находилось два пептида, массы которых соответствовали изучаемому в этой работе пептиду HCRG2 (6151 Да) (выделение и установление структуры описаны ниже) (Gladkikh et al., 2015) и HCGS2.2 (6068 Да), выведенному ранее на основе последовательности гена (Isaeva et al., 2012) (Рисунок 17 А, Б). Во фракции 13б находился пептид с молекулярной массой, идентичной APHC2 (6185 Да) (Andreev et al., 2008), а во фракции 16б – с молекулярной массой, идентичной InhVJ (6106 Да) (Gladkikh et al., 2012) (Рисунок 17 В, Г). В ядовитом секрете *H. magnifica* присутствует большое количество пептидов с молекулярной массой около 6000 Да, обладающих трипсинингибирующей активностью. В связи с этим можно предположить, что пептиды Кунитц-типа *H. magnifica* экспрессируются в виде комбинаторной библиотеки, насчитывающей более 60 представителей (Рисунок 17, Таблицы 4–6), которые, подобно пептидам *H. crispa*, кодируются мультигенным семейством (Isaeva et al., 2012).

3.1.3 Установление аминокислотных последовательностей пептидов

Для того, чтобы установить АП пептидов, содержащихся во фракциях 3а, 16б, 21б и 10в, было проведено восстановление дисульфидных связей дитиотреитолом и алкилирование образовавшихся сульфгидрильных групп 4-винилпиридином. В результате ОФ ВЭЖХ восстановленных пептидов было получено четыре высокоочищенных пептида, массы которых были на 630 Да больше, чем массы нативных пептидов, что свидетельствует о восстановлении трех дисульфидных связей. Восстановленные пептиды фракции 21б не удалось разделить, однако их массы также увеличились на 630 Да. В результате определения N-концевых АП (29 а.о.) пептидов было установлено, что во фракции 21б присутствует токсин RpII (5288 Да) (Рисунок 18 В), модулирующий активность Na_v , который ранее уже был выделен из актинии *H. magnifica* (Schweitz et al., 1985).

Секвенированием N-концевой АП восстановленного пептида (5406 Да) из фракции 10в было определено 42 а.о. Анализ последовательности при помощи алгоритма BLAST базы данных UniProt выявил наличие только одного гомолога (87,5% идентичности), ингибитора α -амилаз из актинии *S. helianthus* (Tysoe et al., 2016). Новый пептид был назван магнификамидом. На основании молекулярной массы и анализа АП было сделано заключение, что 43 и 44 а.о. магнификамида идентичны таковым хелиантамида (Рисунок 18 Б). Магнификамид, подобно хелиантамиду, содержит структурный мотив 7YIYN10,

ответственный за ингибирование α -амилаз (PPA и HPA) (Tysoe et al., 2016), и является, таким образом, вторым представителем ингибиторов α -амилаз семейства β -дефензинов, выделенных из актиний.

Полные АП пептидов Кунитц-типа фракций 3а и 16б были определены в результате объединения последовательностей N-концевого фрагмента и фрагментов, полученных после гидролиза эндопротеиназой Glu-C V8 из *S. aureus*. Анализ АП подтвердил, что во фракции 3а присутствуют пептиды, идентичные HCRG2 (Gladkikh et al., 2015) и HCGS 2.2 (Isaeva et al., 2012) из *H. crispata*, они были названы HMRG1 и HMGS1 соответственно. Пептид фракции 16б оказался идентичен пептиду InhVJ (Gladkikh et al., 2012) из *H. crispata* и был назван HMGS2 (Рисунок 18 А).

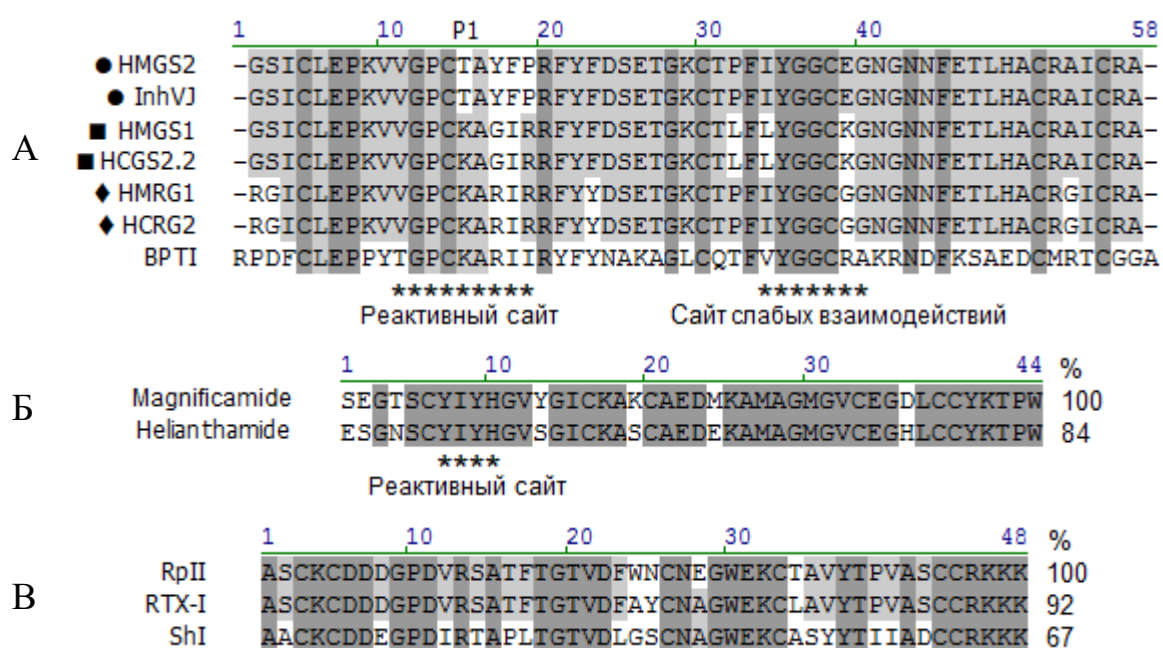


Рисунок 18 – Выравнивание АП (А) пептидов Кунитц-типа: HMRG1, HMGS1, HMGS2 из *H. magnifica*, HCRG1, HCRG2 (Gladkikh et al., 2015), HCGS2.2 (Isaeva et al., 2012), InhVJ (P0DMJ5) (Gladkikh et al., 2012) из *H. crispata*, BPTI (P00974) из *B. taurus* (Helland et al., 1999); (Б) ингибиторов α -амилаз magnificamide из *H. magnifica* и helianthamide (A0A0X1KGZ5) из *S. helianthus* (Tysoe et al., 2016); (В) токсинов RpII (P01534) из *H. magnifica* (Schweitz et al., 1985), RTX-I (P30831) из *H. crispata* (Zykova and Kozlovskaya, 1989), ShI (P19651) из *S. helianthus* (Kem et al., 1989). Идентичные а.о. показаны на темно-сером фоне, консервативные – на светло-сером. Пептиды с идентичными последовательностями отмечены символами (●HMGS2=InhVJ, ■HMGS1=HCGS2.2, ◆HMRG1=HCRG2).

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

Для определения разнообразия транскриптов, кодирующих пептиды Кунитц-типа, был применен метод 3'-RACE. Ген-специфичные праймеры были разработаны на основе последовательностей нативных пептидов Кунитц-типа актиний *H. magnifica* и *H. crispata*

(Таблица 3). В результате ПЦР, клонирования и секвенирования были получены последовательности пяти изоформ (Рисунок 19).

GSP1	1	AACCACAACAGAGAGCAAAGACAAGATAACAAGATGAAGGGAACTTTTCTTATTGTCTGATCCTAATTGCAGGTTTCTCT	81
GSP2	1	AACCACAACAGAGAGCAAAGACAAGATAACAAGATGAAGGGAACTTTTCTTATTGTCTGATCCTAATTGCAGGTTTCTCT	81
GSP3	1	AACCACAACAGAGAGCAAAGACAAGATAACAAGATGAAGGGAACTTTTCTTATTGTCTGATCCTAATTGCAGGTTTCTCT	81
		M K G T F L I C L I L I A G F S	
		P K V V G P C X ₁ A X ₂ X ₃ R R F Y	
Hm3_1	1	CCTAAGGTTGTAGGACCGTGCAATGCACGTATTCGAAGATTCTAC	45
Hm3_2	1	CCTAAGGTTGTAGGACCATGCAAAGCACGTATTCGAAGATTCTAC	45
Hm3_3	1	CCTAAGGTTGTAGGACCTTGCACTGCGTATTCGAAGATTCTAC	45
Hm3_8	1	CCTAAGGTTGTAGGACCTGTAAAGCACGTATTCGAAGATTCTAC	45
Hm3_10	1	CCTAAGGTTGTAGGACCATGTAAAGCACGTATTCGAAGATTCTAC	45
GSP1	82	TTCAAAGCACTCAAGCCGGTAGCATTTGTTAGAACCCAAAGTAGTGGCCCGGTAAAGCAGTATTCGAAGATTCTAC	162
GSP2	82	TTCAAAGCACTCAAGCCGGTAGCATTTGTTAGAACCCAAAGTAGTGGCCCGGTAAAGCAGTATTCGAAGATTCTAC	162
GSP3	82	TTCAAAGCACTCAAGCCGGTAGCATTTGTTAGAACCCAAAGTAGTGGCCCGGTAAAGCAGTATTCGAAGATTCTAC	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	
		X ₄ X ₅ X ₆ E T G K C T P F I Y G G C X ₇ G N G N N F E T L X ₈	
Hm3_1	46	TACGATTTCAGAGACTGGAAAGTGCACACCGTTTCATCTACGGTGGATGCGGGGAAATGGGAATAACTTTGAGACCCTGCAT	126
Hm3_2	46	TACGATTTCAGAGACTGGAAAGTGCACACCGTTTCATCTACGGTGGATGCGGGGAAATGGGAATAACTTTGAGACCCTGCAT	126
Hm3_3	46	TCGATTTCAGAGACTGGAAAGTGCACACCGTTTCATCTACGGTGGATGCGGGGAAATGGGAATAACTTTGAGACCCTGCAT	126
Hm3_8	46	TACGATTTCAGAGACTGGAAAGTGCACACCGTTTCATCTACGGTGGATGCGGGGAAATGGGAATAACTTTGAGACCCTGCAT	126
Hm3_10	46	TACGATTTCAGAGACTGGAAAGTGCACACCGTTTCATCTACGGTGGATGCGGGGAAATGGGAATAACTTTGAGACCCTGCAT	126
GSP1	163	TTTCGATTTCAGAGACTGGAAAGTGCACACCGTTTCATCTACGGTGGATGCGGGGAAATGGGAATAACTTTGAGACCCTGCAT	243
GSP2	163	TTTCGATTTCAGAGACTGGAAAGTGCACACCGTTTCATCTACGGTGGATGCGGGGAAATGGGAATAACTTTGAGACCCTGCAT	243
GSP3	163	TTTCGATTTCAGAGACTGGAAAGTGCACACCGTTTCATCTACGGTGGATGCGGGGAAATGGGAATAACTTTGAGACCCTGCAT	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	GCATGCCGAGGTATATGCAGGGCGTAATCTTGTTAGAAGAGCAATGAGAAGTTAGAAATGCTACAAAAATCAAAATAAAG	207
Hm3_2	127	GCATGCCGAGGTATATGCAGGGCGTAATCTTGTTAGAAGAGCAATGAGAAGTTAGAAATGCTACAAAAATCAAAATAAAG	207
Hm3_3	127	GCATGCCGAGGTATATGCAGGGCGTAATCTTGTTAGAAGAGCAATGAGAAGTTAGAAATGCTACAAAAATCAAAATAAAG	207
Hm3_8	127	GCATGCCGAGGTATATGCAGGGCGTAATCTTGTTAGAAGAGCAATGAGAAGTTAGAAATGCTACAAAAATCAAAATAAAG	207
Hm3_10	127	GCATGCCGAGGTATATGCTGGGCGTAATCTTGTTAGAAGAGCAATGAGAAGTTAGAAATGCTACAAAAATCAAAATAAAG	207
GSP1	244	GCATGCCGAGGTATATGCAGGGCGTAATCTTGTTAGAAGAGCAATGAGAAGTTAGAAATGCTACAAAAATCAAAATAAAG	324
GSP2	244	GCATGCCGAGGTATATGCAGGGCGTAATCTTGTTAGAAGAGCAATGAGAAGTTAGAAATGCTACAAAAATCAAAATAAAG	324
GSP3	244	GCATGCCGAGGTATATGCAGGGCGTAATCTTGTTAGAAGAGCAATGAGAAGTTAGAAATGCTACAAAAATCAAAATAAAG	324
		A C R A I C R A stop	
Hm3_1	208	ATAAAAATAAAAGATGTAAATTCATTAACGTGGATTAAATAATTGTATTAAGTGAAGTGGGAAATGGGAAATAAAGGATGCCAATCC	288
Hm3_2	208	ATAAAAATAAAAGATGTAAATTCATTAACGTGGATTAAACAATTGTATTAAGAGAAAATGGGAAATAAAGGATGCCAATCC	288
Hm3_3	208	ATAAAAATAAAAGATGTAAATTCATTAACGTGGATTAAACAATTGTATTAAGAGAAAATGGGAAATAAAGGATGCCAATCC	288
Hm3_8	208	ATAAAAATAAAAGATGTAAATTCATTAACGTGGATTAAATAATTGTATTAAGTGAAGTGAAGTGGGAAATAAAGGATGCCAATCC	288
Hm3_10	208	ATAAAAATAAAAGATGTAAATTCATTAACGTGGATTAAACAATTGTATTAAGAGAAAATGGGAAATAAAGGATGCCAATCC	288
GSP1	325	ATAAAAATAAAAGATGTAAATTCATTAACGTGGATTAGTAATTGTATTAAGAGAAAATGGGAAATAAAGGATGCCAATCC	405
GSP2	325	ATAAAAATAAAAGATGTAAATTCATTAACGTGGATTAGTAATTGTATTAAGAGAAAATGGGAAATAAAGGATGCCAATCC	405
GSP3	325	ATAAAAATAAAAGATGTAAATTCATTAACGTGGATTAGTAATTGTATTAAGTGAAGTGAAGTGGGAAATAAAGGATGCCAATCC	405
Hm3_1	289	ACAAAAA	319
Hm3_2	289	ACTAAAAA	314
Hm3_3	289	ACTAAAAA	319
Hm3_8	289	ACAAAAA	320
Hm3_10	289	ACTAAAAA	319
GSP1	406	ACTAAAAA	435
GSP2	406	ACTAAAAA	435
GSP3	406	ACTAAAAA	427

Рисунок 19 – Выравнивание нуклеотидных последовательностей 3'-RACE кДНК (Hm3_1–Hm3_3, Hm3_8, и 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 конценсусной АП, выведенной на основе нуклеотидных последовательностей сверху *H. magnifica* и снизу *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.

Последовательности Nm3_1 и Nm3_3 были преобладающими, они составляли 37,5 и 25% обнаруженных транскриптов соответственно. Установлено, что вариабельные остатки выведенных АП 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 X₇). Большинство замен аминокислотных остатков находится в тех же позициях, что и в пептидах *H. crispera*, за исключением позиций X₄–X₆ и X₈–X₁₀ (Рисунок 19).

Для получения последовательностей транскриптов, кодирующих зрелые пептиды *H. magnifica*, были разработаны ген-специфичные праймеры, направленные на N- и C-концевые фрагменты пептидов (Таблица 3). В результате ПЦР, клонирования и секвенирования были получены четыре уникальные последовательности (HMGS3c1, HMGS3c4, HMGS3c6 и HMGS3c9) (Рисунок 20). Нуклеотидные последовательности данных транскриптов оказались высокоидентичны (до 100%) последовательностям мультигенного HCGS субсемейства пептидов Кунитц-типа актинии *H. crispera*, 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 13б. Последовательности пептидов HMGS3c1 и HMGS3c9 были идентичны последовательностям APHC2 и HCGS2.27 соответственно, в то время как пептиды HMGS3c4 и HMGS3c6 были обнаружены только в *H. magnifica* (Рисунок 20).

	1	10	P1	20	30	40	58	%
HMGS1	-GSICLEPKVVGPC	KAGIRRFYFDSETG	KCTLF	LYGGCKGNGN	FFETLHACRAICRA-			100
HCGS2.2	-GSICLEPKVVGPC	KAGIRRFYFDSETG	KCTLF	LYGGCKGNGN	FFETLHACRAICRA-			100
HCGS2.27	-GSICLEPKVVGPC	KAGIRRFYFDSETG	KCTPFI	YGGCEGNGN	FFETLHACRAICRA-			95
HMGS3c6	-GSICLEPKVVGPC	KARIRRFYFDSETG	KCTPFI	YGGCEGNGN	FFETLRACRAICRA-			91
HMGS3c9	-GSICLEPKVVGPC	KAGIRRFYFDSETG	KCTPFI	YGGCEGNGN	FFETLHACRAICRA-			95
HMGS2	-GSICLEPKVVGPC	TAYFRRFYFDSETG	KCTPFI	YGGCEGNGN	FFETLHACRAICRA-			88
InhVJ	-GSICLEPKVVGPC	TAYFRRFYFDSETG	KCTPFI	YGGCEGNGN	FFETLHACRAICRA-			88
APHC1	-GSICLEPKVVGPC	TAYFRRFYFDSETG	KCTPFI	YGGCEGNGN	FFETLRACRAICRA-			88
HMGS3c1	-GSICLEPKVVGPC	TAYFRRFYFDSETG	KCTPFI	YGGCEGNGN	FFETLRACRAICRA-			88
APHC2	-GSICLEPKVVGPC	TAYFRRFYFDSETG	KCTPFI	YGGCEGNGN	FFETLRACRAICRA-			88
APHC3	-GSICLEPKVVGPC	TAYFRRFYFNSETG	KCTPFI	YGGCEGNGN	FFETLRACRAICRA-			82
HMGS3c4	-GSICLEPKIVGPC	TAYFRRFYFDSETG	KCTPFI	YGGCEGNGN	FFETLRACRAICRA-			86
SHPI-1	--SICSEPKVGRCKGY	FRFYFDSETG	KCTPFI	YGGCGGNGN	FFETLHQCRAICRA-			80
BPTI	RPDFCLEPPYTGPCK	ARIIRYFYNAKAGL	QTEFVYGGC	RAKRND	EKSAEDCMRTGGA			39
		*****		*****				
		Реактивный сайт		Сайт слабых взаимодействий				

Рисунок 20 – Выравнивание АП пептидов Кунитц-типа актиний семейства Stichodactylidae: HMGS1 (C0HK73), HMGS2 (C0HK74), HMGS3c1, HMGS3c4, HMGS3c6, HMGS3c9 из *H. magnifica*, HCGS2.27, HCGS2.2 (Isaeva et al., 2012), APHC1–APHC3 (B2G331, C0HJF4, C0HJF3) (Andreev et al., 2008; Kozlov et al., 2009), InhVJ (P0DMJ5) (Gladkikh et al., 2012) из *H. crispera*, SHPI-1 (P31713) из *S. helianthus* (Delfin et al., 1996), BPTI (P00974) из *B. taurus* (Helland et al., 1999). Остаток P1 реактивного сайта пептидов Кунитц-типа указан над последовательностями.

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 из *H. crispa*. 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.

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

В течение 50 лет обнаружение биологически активных пептидов актиний проводили с помощью комбинации методов жидкостной хроматографии, сопровождающейся тестированием активности получаемых фракций (Andreev et al., 2012, 2008; Castañeda et al., 1995; Delfin et al., 1996; Eid et al., 2008; Gendeh et al., 1997; Gladkikh et al., 2012; Honma et al., 2008; Kem et al., 1989; Khoo et al., 1993; Monastyrnaya et al., 2010; Samejima et al., 2000; Schweitz et al., 1995, 1985; Shiomi et al., 2003; Valcarcel et al., 2001; Yamaguchi et al., 2010; Zyкова et al., 1985; Zyкова and Kozlovskaya, 1989). Такой подход позволил обнаружить множество нейро- и α -пороформирующих токсинов, ингибиторов протеиназ и α -амилаз. Он до сих пор остается востребованным, регулярно появляются научные статьи, посвященные выделению биологически активных пептидов актиний и обнаружению новых мишеней их действия (Logashina et al., 2017; Osmakov et al., 2013; Tysoe et al., 2016).

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 выделения пептидов использовали схему, включающую гель-фильтрацию на акрилексе P-4 и катионообменную хроматографию на целлюлозе KM-32. В данной работе (Gladkikh et al., 2015) нами было проведено разделение пептидов с помощью ОФ ВЭЖХ на колонке Nucleosil C₁₈. В результате было получено два пептида, названных HCRG1 и HCRG2 (Рисунок 21 А), которые ингибировали трипсин. Молекулярные массы пептидов, согласно масс-спектрометрическому анализу, составили 6196 Да для HCRG1 и 6149 Да для HCRG2 (Рисунок 21 Б, В).

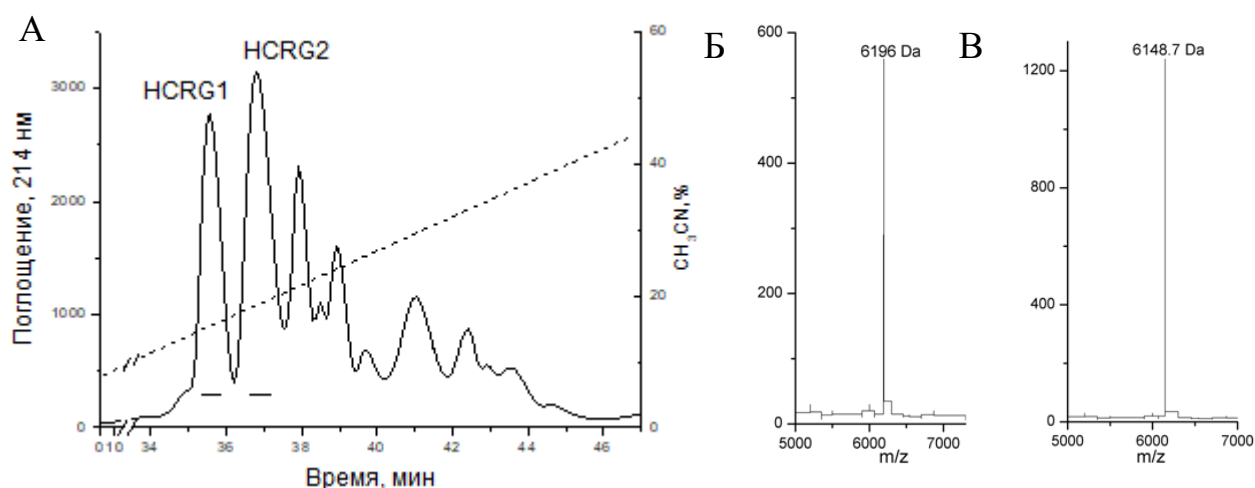


Рисунок 21 – (А) Профиль элюции пептидов ОФ ВЭЖХ на колонке Nucleosil C₁₈ в линейном градиенте концентрации CH₃CN (10–70%). Сплошной линией отмечены границы объединения фракций, ингибирующих трипсин. Масс-спектры пептидов HCRG1 (Б) и HCRG2 (В).

Для установления аминокислотных последовательностей пептидов HCRG1 и HCRG2 было проведено восстановление дисульфидных связей дитиотреитолом и алкилирование образовавшихся сульфгидрильных групп 4-винилпиридином. В результате разделения модифицированных пептидов с помощью ОФ ВЭЖХ были получены пептиды, имеющие молекулярную массу 6824 Да и 6775 Да, соответствующую HCRG1 и HCRG2, алкилированным по 6 остаткам Cys. N-концевая АП пептидов HCRG1 и HCRG2 (43 и 29 а.о.) была определена методом деградации по Эдману. Для установления полной АП был проведен гидролиз восстановленных пептидов эндопротеиназой Glu-C V8 из *S. aureus*. В результате разделения реакционной смеси с помощью ОФ ВЭЖХ было получено 5 и 4 пептидных фрагмента для HCRG1 и HCRG2 соответственно. Полные АП были установлены на основании сравнения результатов секвенирования фрагментов последовательностей с известными последовательностями пептидов Кунитц-типа (Рисунок 22).

	1	10	P1	20	30	40	58 %	
HCRG1	-RGICSEPKVVGPC	KAGLR	RRFY	YDSETG	ECLPFI	YGGCKGN	KNNFETLHACRGICRA-	100
HCRG2	-RGICLEPKVVGPC	KARIR	RRFY	YDSETG	KCTPFI	YGGCGNG	NNFETLHACRGICRA-	88
APHC1	-GSICLEPKVVGPC	TAYFR	RRFY	FDSETG	KCTVFI	YGGCEGN	GNNFETLRACRAICRA-	75
APHC2	-GSICLEPKVVGPC	TAYFR	RRFY	FDSETG	KCTPFI	YGGCEGN	GNNFETLRACRAICRA-	77
APHC3	-GSICLEPKVVGPC	TAYFP	RFYFN	SETGK	CTPFI	YGGCEGN	GNNFETLRACRGICRA-	75
InhVJ	-GSICLEPKVVGPC	TAYFP	RFYFD	SETGK	CTPFI	YGGCEGN	GNNFETLRACRAICRA-	77
BPTI	RPDFCLEFPYT	GPCKA	RIIRY	FYNAG	SLCQTF	VYGGC	RAKRNNFKSAEDCMRTGGGA	39
	*****				*****			
	Реактивный сайт				Сайт слабых взаимодействий			

Рисунок 22 – Выравнивание АП ингибиторов протеиназ Кунитц-типа: HCRG1, HCRG2 (Gladkikh et al., 2015), InhVJ (P0DMJ5) (Gladkikh et al., 2012), APHC1–APHC3 (B2G331, C0HJF4, C0HJF3) (Andreev et al., 2008; Kozlov et al., 2009) из *H. crista*, BPTI (P00974) из *B. taurus* (Helland et al., 1999). Идентичные а.о. показаны на темно-сером фоне, консервативные – на светло-сером. Остаток P1 реактивного сайта пептидов указан над АП.

Аминокислотные последовательности HCRG1 и HCRG2 оказались на 75–77% идентичны последовательностям пептидов Кунитц-типа, APHC1–APHC3 и InhVJ, выделенным ранее из *H. crispa*, в отличие от которых HCRG1 и HCRG2, как и БПТИ, содержат остаток Lys в положении P1 реактивного сайта (Рисунок 22). Данные пептиды, наряду с InhVJ, являются основными компонентами яда актинии *H. crispa*.

Из H. crispa выделено два новых пептида Кунитц-типа и установлены их АП, данные пептиды в большом количестве присутствуют в яде актинии.

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

В данной работе было установлено, что ингибиторы протеиназ Кунитц-типа являются основными компонентами ядовитого секрета *H. magnifica* (Sintsova et al., 2018), а некоторые представители оказались идентичными пептидам Кунитц-типа актинии *H. crispa*. В связи с этим нами был проведен филогенетический анализ, согласно результатам которого пептиды Кунитц-типа актиний семейства Stichodactylidae могут быть сгруппированы в четыре кластера (Рисунок 23). Кластер I содержит пептиды, у которых в положении P1 находится, как и в 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. crispa* (Isaeva et al., 2012). Биологическая активность представителей данного кластера еще не изучена. Кластер II состоит из пептидов, содержащих в P1 положении остаток Thr (Рисунок 23, 24). Пептиды APHC1 и APHC3, входящие в состав этого кластера, кроме ингибирования активности трипсина и α -химотрипсина модулируют активность TRPV1 и обладают анальгетическим действием *in vivo* (Nikolaev et al., 2017). Наибольшим процентом идентичности АП обладают HCGS1.10, HCGS1.36, HCRG21, также входящие в состав этого кластера. Кластер III включает в себя пептиды, которые содержат остаток Arg в положении P1 (Рисунок 23, 24), а также пептиды из актинии *S. helianthus*, ShPI-1 и ShPI-2, содержащие лизин в положении P1. Пептид ShPI-1 ингибирует активность протеиназ различных классов (сериновые, цистеиновые, аспарагиновые) и блокирует K_v (García-Fernández et al., 2016). Наибольшим процентом идентичности АП относительно ShPI-1 обладает HCGS1.19. Блокатор K_v , пептид SHTXIII (Honma et al., 2008), и подобные ему пептиды *H. crispa* и *S. mertensii* формируют кластер IV. Ранее было показано, что наиболее представленными являются РНК генов, кодирующих пептиды HCTX1 и SMTX1, входящие в этот кластер (Чаусова, 2012).

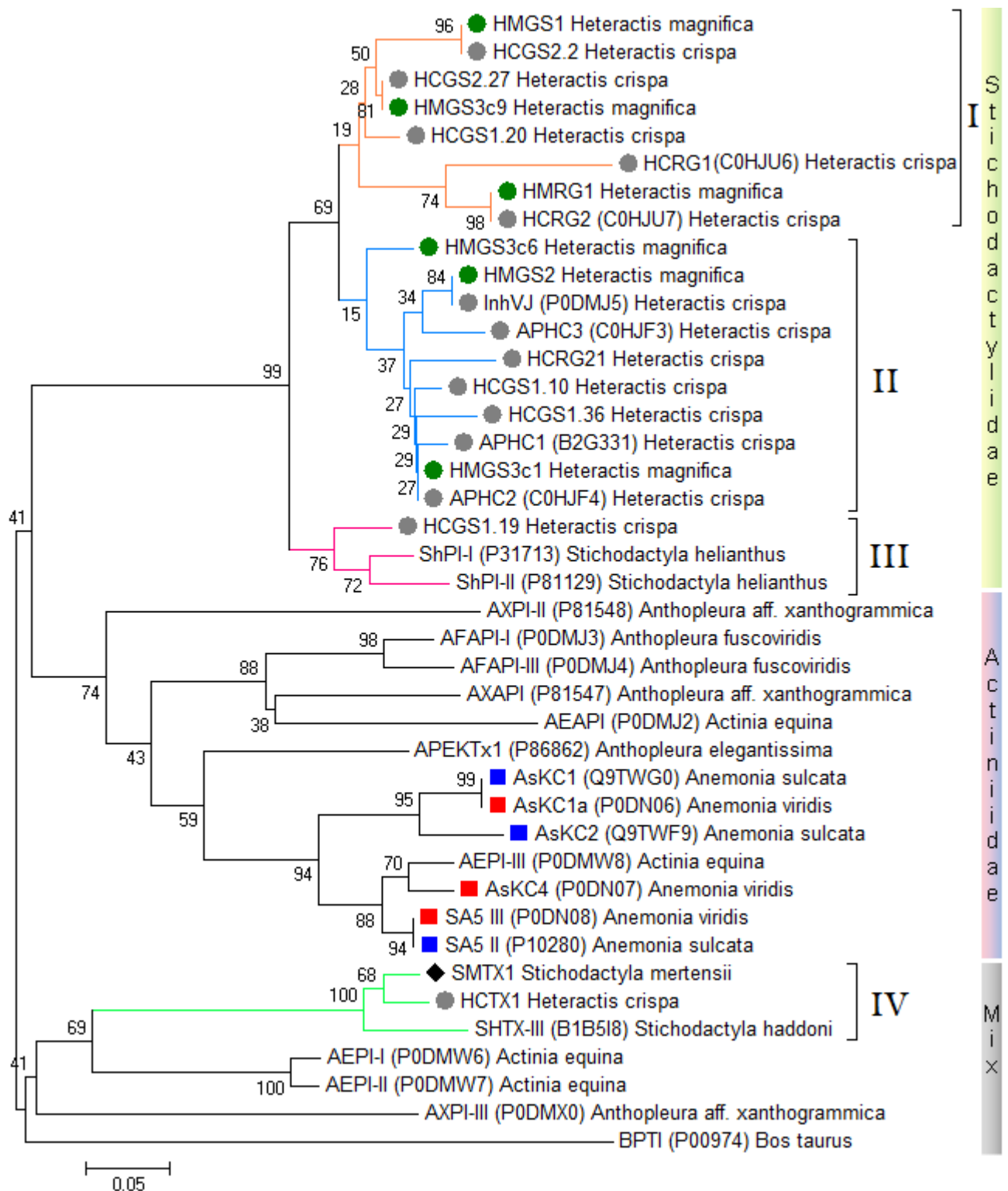


Рисунок 23 – Филогенетическое дерево пептидов Кунитц-типа актиний и БПТИ, построенное методом ближайшего соседа (NJ) в MEGA 7. Пептиды из *H. magna* отмечены зелеными кругами, из *H. crisa* – серыми кругами, из *A. sulcata* – синими квадратами, из *A. viridis* – красными квадратами, из *S. mertensii* – черным ромбом.

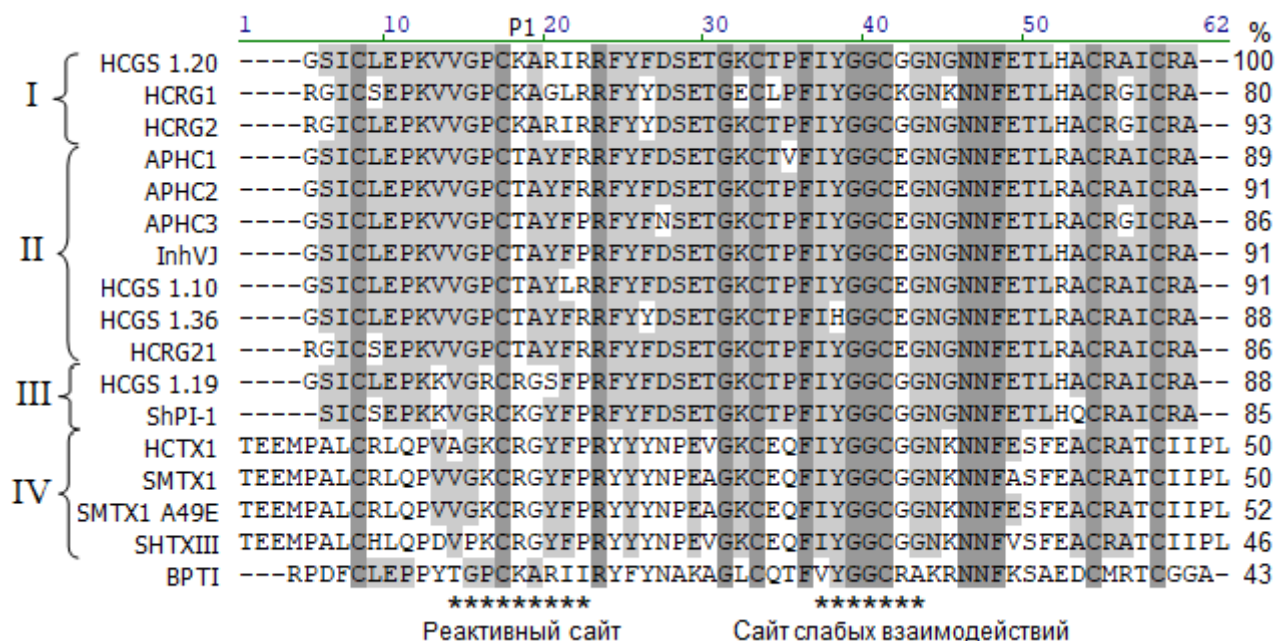


Рисунок 24 – Выравнивание АП пептидов Кунитц-типа APHC1 (B2G331) (Andreev et al., 2008), APHC2 (C0HJF4) (Kozlov et al., 2009), APHC3 (C0HJF3) (Kozlov et al., 2009), InhVJ (P0DMJ5) (Gladkikh et al., 2012), HCRG1, HCRG2, rHCRG21, rHCGS1.10, rHCGS1.19, rHCGS1.20, rHCGS1.36 (Isaeva et al., 2012), rHCTX1 из актинии *H. crista*, rSMTX1 и rSMTX1_A49E из *S. mertensii*, SHTXIII (B1B5I8) из *S. haddoni* (Honma et al., 2008), ShPI-1 (P31713) из *S. helianthus* (Delfin et al., 1996) и BPTI (P00974) из *B. taurus* (Helland et al., 1999). Идентичные а.о. показаны на темно-сером фоне, консервативные – на светло-сером. Остаток P1 реактивного сайта пептидов Кунитц-типа указан над последовательностями.

Среди пептидов актиний *H. crista* и *H. magnifica* 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, которые содержат 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 *H. crista* (Isaeva et al., 2012; Чаусова, 2012). 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 (Рисунок 23).

Большое разнообразие пептидов Кунитц-типа, присутствующих в ядовитом секрете актиний, обеспечивает выполнение функций, необходимых для успешного существования этих животных 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 актиний *H. crispa* 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. crispa*, а также SMTX1 из *S. mertensii*, с целью получения их рекомбинантных аналогов.

3.4 Получение рекомбинантных пептидов Кунитц-типа

Для создания экспрессионных конструкций был выбран плазмидный вектор pET-32b(+), который позволяет получать рекомбинантные пептиды в составе гибридного белка, состоящего из целевого пептида, белка партнера – тиоредоксина (Trx) и полигистидиновой последовательности (6×His) (Рисунок 25 Б).

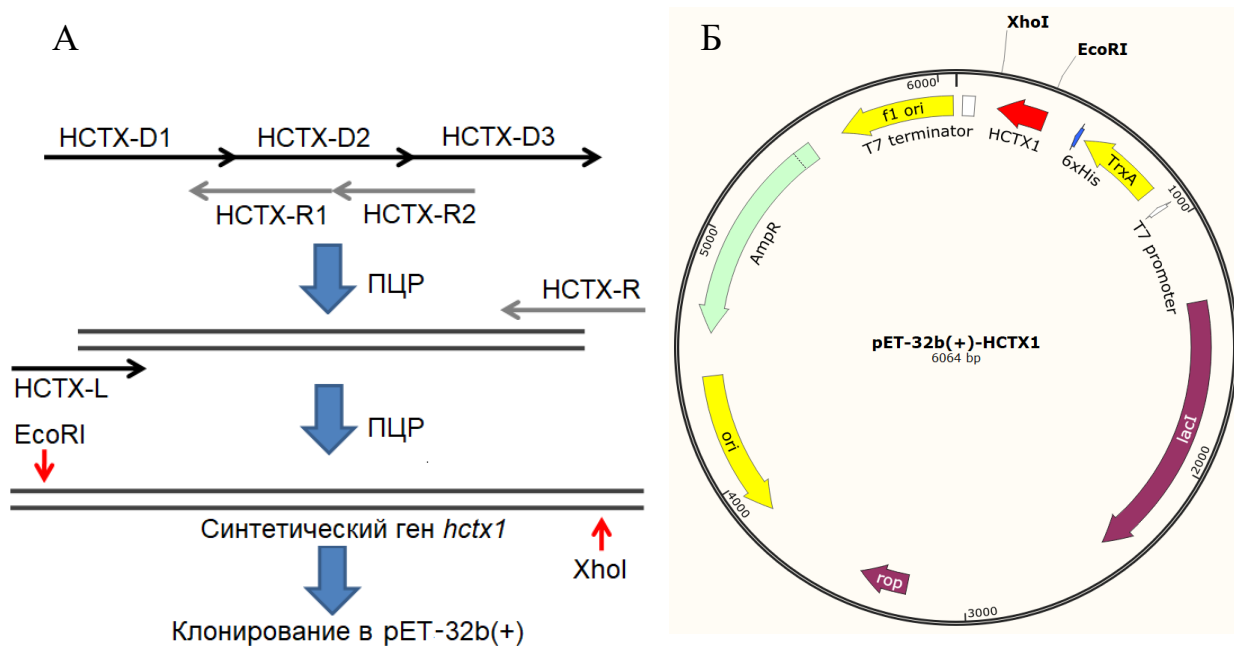


Рисунок 25 – (А) Схема сборки искусственного гена на примере *hctx1*. (Б) Карта экспрессионной конструкции на основе плазмидного вектора pET-32b(+). HCTX1 кодирует зрелый пептид, Amp – β-лактамазу, Trx – тиоредоксин, His-Tag – полигистидиновую последовательность, Stop – стоп-кодон, Met – кодон метионина, EcoRI, XhoI – сайты рестрикции.

Тиоредоксин обеспечивает корректное замыкание дисульфидных связей, а полигистидиновая последовательность хелатирует ионы Ni^{2+} в процессе металл-аффинной хроматографии, что существенно облегчает выделение гибридного белка из клеточного лизата. Для выделения целевого пептида гибридный белок расщепляют бромистым цианогеном по остаткам Met, введенным перед последовательностью целевого пептида, но

так как SHTXIII-подобные пептиды содержат остаток Met4, это делает невозможным отделение целевого пептида от гибридного белка с помощью гидролиза бромистым цианогеном. Поэтому в аминокислотной последовательности SHTXIII-подобных пептидов, НСТХ1 и SMTX1, была произведена замена Met4Leu (Рисунок 24), которая оказывает минимальное влияние на третичную структуру пептида. Из набора праймеров (Таблица 3) в результате двух этапов ПЦР были собраны искусственные гены, кодирующие пептиды НСТХ1, SMTX1, а также мутантный пептид SMTX1_A49E (Рисунок 25 А). Для получения экспрессионной конструкции фрагмент, кодирующий целевой пептид, клонировали по сайтам рестрикции *EcoRI* и *XhoI* в вектор рЕТ-32b(+) (Рисунок 25 Б). Гетерологичную экспрессию пептидов проводили в клетках штамма *E. coli* BL21(DE3) и целевые пептиды выделяли по оптимизированной нами методике (Sintsova et al., 2015). Время удерживания целевых пептидов при их разделении ОФ ВЭЖХ составило около 29 минут для каждого (на рисунке 26 в качестве примера приведен профиль элюции пептида гНСТХ1).

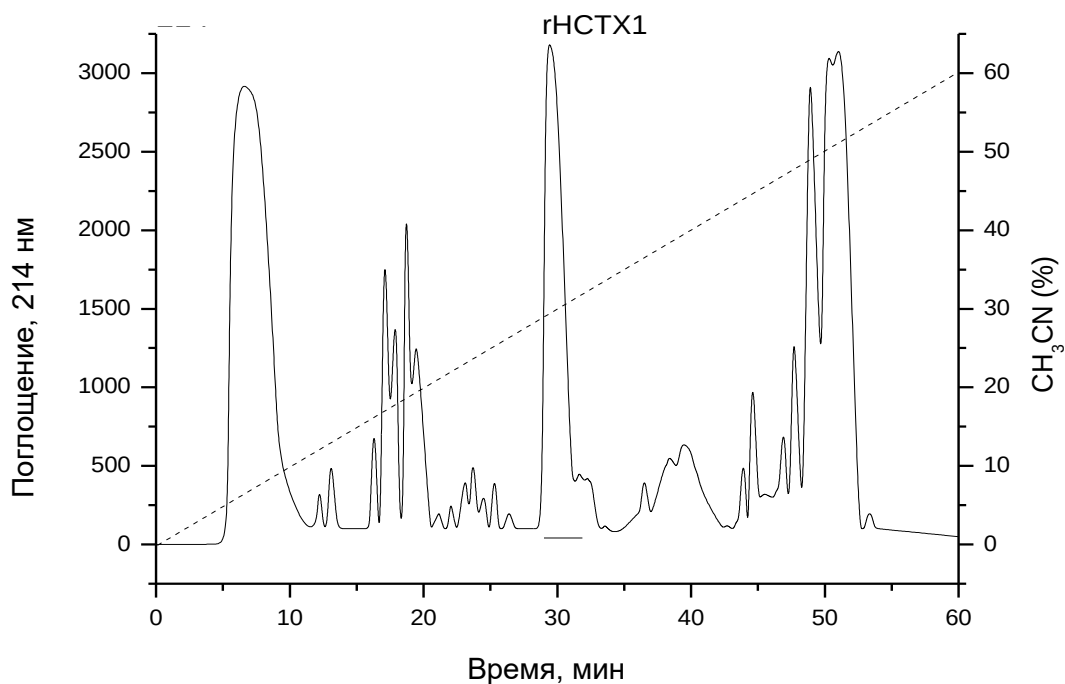


Рисунок 26 – Профиль элюции компонентов реакционной смеси, содержащей пептид гНСТХ1, ОФ ВЭЖХ на колонке Jupiter C4 в линейном градиенте концентрации CH_3CN (0–60%). Трипсинингибирующая активность показана сплошной линией.

Согласно данным МС анализа, молекулярная масса пептидов гНСТХ1, гSMTX1 и гSMTX1_A49E составила 6980 Да, 6922 Да и 6980 Да (Рисунок 27) соответственно, что подтверждает расчетные данные. Определение N-концевых последовательностей рекомбинантных пептидов подтвердило их идентичность выведенным аминокислотным

последовательностям. Средний выход пептидов составил от 8 до 20 мг на литр клеточной культуры (оптическая плотность $A_{600} = 0,6-0,8$).

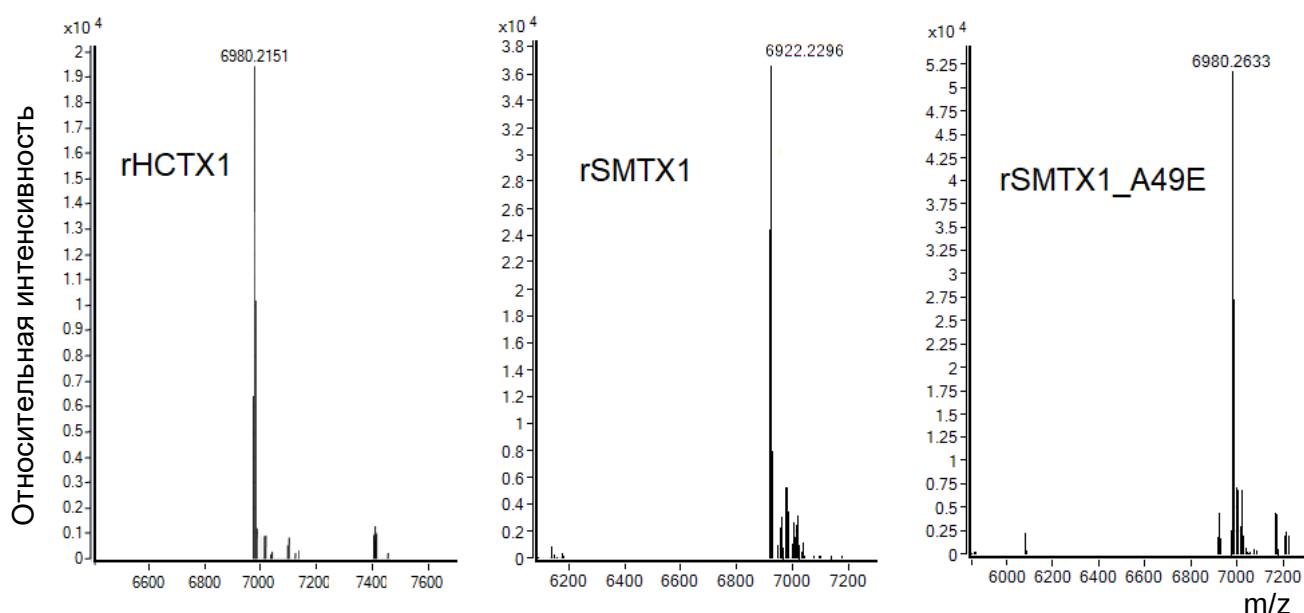


Рисунок 27 – Масс-спектры пептидов rHCTX1, rSMTX1 и rSMTX1_A49E после разделения ОФ ВЭЖХ.

Рекомбинантные пептиды HCGS1.10, HCGS1.19, HCGS1.20, HCGS1.36, HCRG21, а также аналог нативного пептида InhVJ были получены с помощью готовых экспрессионных конструкций на основе вектора pET-32b(+) по методике, описанной выше. Чистоту полученных 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 и 6229 Да для rHCRG21 (Рисунок 28), 6107 Да для rInhVJ (Рисунок 30). Средний выход пептидов составил от 4 до 20 мг на литр клеточной культуры ($A_{600} = 0,6-0,8$). Такая разница в продуктивности может быть обусловлена тем, что некоторые конструкции содержали редкие кодоны в последовательности гена, кодирующего целевой пептид (rHCGS1.19, rHCGS1.20, rHCGS1.36). Продуктивность таких конструкций оказалась ниже и составила 4–8 мг на литр клеточной культуры ($A_{600} = 0,6-0,8$). Конструкции, не содержащие редких кодонов, оказались более эффективными для получения целевых пептидов (rHCGS1.10, rHCRG21, rInhVJ, rHCTX1, rSMTX1 и rSMTX1_A49E). При помощи таких конструкций было получено 6–20 мг целевых пептидов на литр клеточной культуры ($A_{600} = 0,6-0,8$).

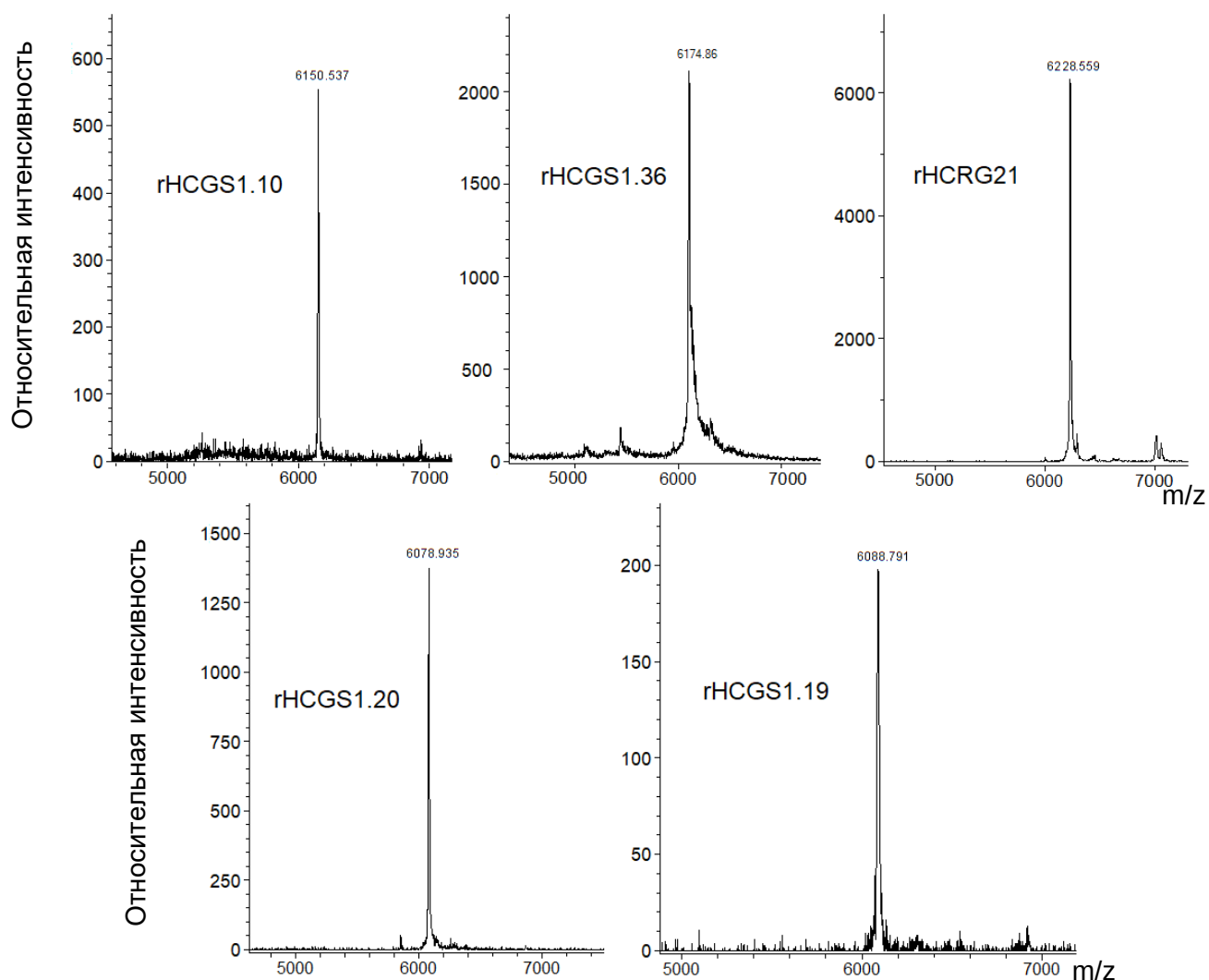


Рисунок 28 – Масс-спектры пептидов rHCGS1.10, rHCGS1.19, rHCGS1.20, rHCGS1.36, rHCRG21 после разделения ОФ ВЭЖХ.

Так как все целевые пептиды были обнаружены только на уровне РНК транскриптов, было решено получить рекомбинантный аналог нативного пептида InhVJ(=HMGS2) с целью сравнения физико-химических характеристик нативного и рекомбинантного пептидов. Для InhVJ и rInhVJ было проведено сравнение времен удерживания в идентичных условиях элюции ОФ ВЭЖХ, установлены молекулярные массы методом масс-спектрометрического анализа, получены спектры кругового дихроизма, а также определены K_i трипсина (Таблица 8). В результате аналитической ОФ ВЭЖХ очищенных InhVJ и rInhVJ было показано, что времена удерживания пептидов одинаковы и равны 31 минуте (Рисунок 29 А, Б). На профиле элюции смеси InhVJ и rInhVJ наблюдался симметричный пик, время удерживания которого было идентично временам удерживания индивидуальных пептидов (Рисунок 29 В). МС анализ показал, что молекулярная масса рекомбинантного InhVJ идентична массе нативного InhVJ (Рисунок 30).

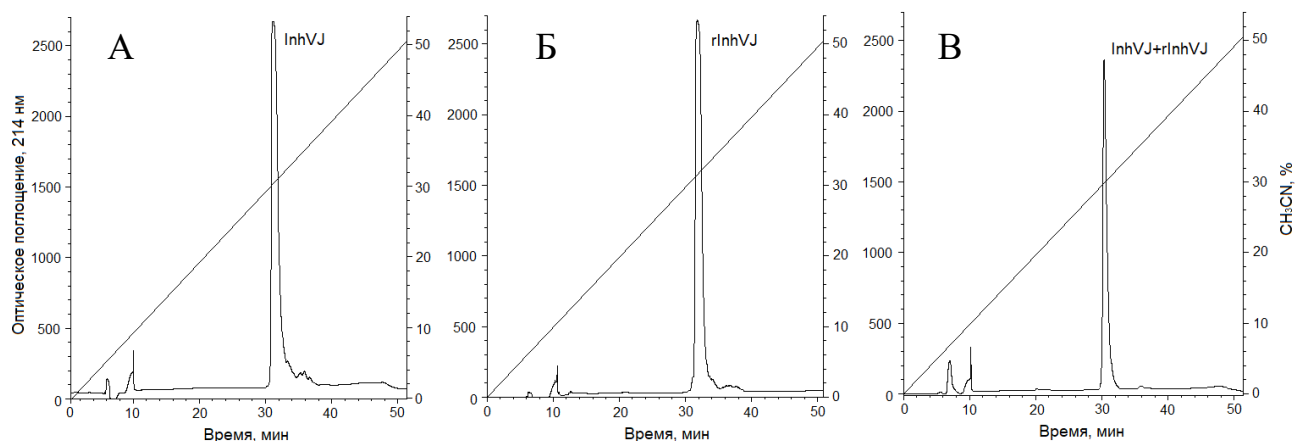


Рисунок 29 – Профили элюции (А) InhVJ, (Б) rInhVJ, а также смеси (В) InhVJ+rInhVJ ОФ ВЭЖХ на колонке Nucleosil C₁₈ в линейном градиенте концентрации CH₃CN (0–50%).

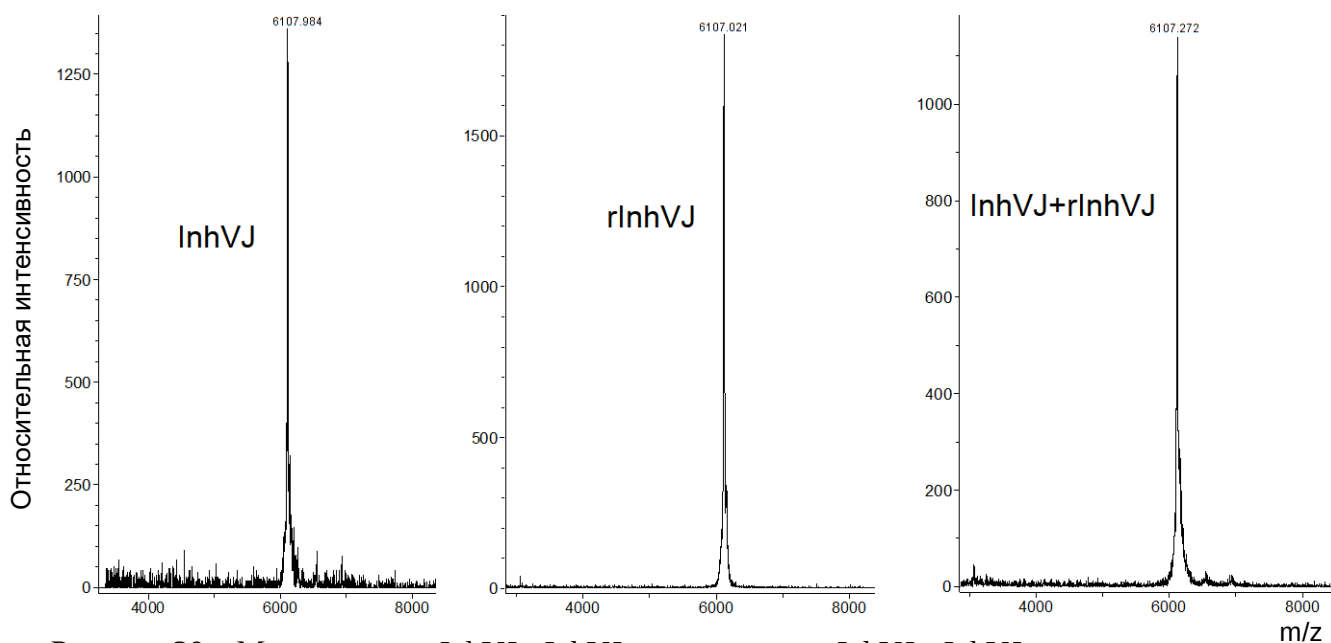


Рисунок 30 – Масс-спектры InhVJ, rInhVJ, а также смеси InhVJ+rInhVJ.

Пространственная организация InhVJ и rInhVJ на уровне вторичной и третичной структуры была изучена методом спектроскопии кругового дихроизма (КД). Было показано, что в ближней УФ-области (230–310 нм) спектры КД InhVJ и rInhVJ имеют четко выраженную структуру с отрицательными полосами, соответствующими ароматическим аминокислотным остаткам. Для rInhVJ элементы третичной структуры выражены более четко (Рисунок 31 А). В спектрах также присутствует отрицательная полоса высокой эллиптичности при 240 нм, которая обусловлена дисульфидными связями. Выраженная тонкая структура спектра указывает на существенную асимметрию окружения ароматических аминокислотных остатков, их жесткую фиксацию в молекуле и высокоорганизованную третичную структуру рекомбинантного пептида. Спектры КД InhVJ и rInhVJ в дальней (190–240 нм) УФ-области (Рисунок 31 Б), области поглощения пептидных

связей, характеризуются минимумом при 202 нм и максимумом при 193 нм. В области 225–230 нм на кривой спектра наблюдается отчетливое плечо, обусловленное вкладом поглощения дисульфидных групп.

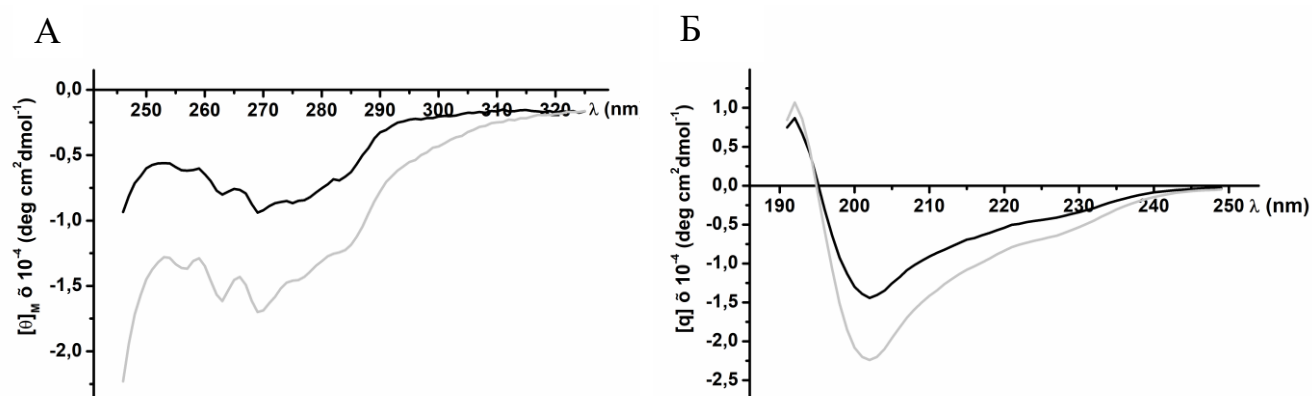


Рисунок 31 – Спектры КД пептидов InhVJ (черная линия) и rInhVJ (серая линия) в 0,01 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,0, в (А) ближней и в (Б) дальней УФ-области.

Во вторичной структуре рекомбинантного пептида по сравнению со структурой нативного пептида увеличена доля α -спиралей и снижено содержание β -листов (Таблица 7). Перераспределение содержания элементов вторичной структуры и сдвиг максимума поглощения на 1–2 нм в коротковолновую область в спектрах КД рекомбинантного пептида могут быть, по-видимому, обусловлены его незначительной денатурацией, связанной с процессом получения и очистки. Ранее подобный эффект наблюдали в спектрах КД рекомбинантных аналогов других пептидов актиний, при этом их активность не отличалась от таковой нативных пептидов (Tysoe et al., 2016). K_i трипсина рекомбинантным аналогом InhVJ ($7,8 \times 10^{-8}$), определенная методом Диксона (Dixon, 1953), оказалась практически равной K_i трипсина нативным пептидом ($7,4 \times 10^{-8}$) (Таблица 8).

Таблица 7 – Содержание элементов вторичной структуры пептидов, %

Пептид	Спираль			β -Листы	Повороты		Неупорядоченная структура
	α	3_{10}	сумма		β -Изгиб	PP2	
rInhVJ	12,4	8,7	21,1	10,1	18,0	6,5	44,3
InhVJ	6,9	8,8	15,7	16,3	15,7	9,3	43,0

На основании анализа последовательностей отобрано, синтезировано в бактериальной системе и выделено восемь рекомбинантных пептидов, представителей дивергентных групп пептидов Кунитц-типа актиний семейства Stichodactylidae в количествах, достаточных для исследования их активности. Получен рекомбинантный аналог пептида InhVJ, и проведено сравнение его свойств со свойствами нативного пептида. Показано, что рекомбинантный и нативный InhVJ имеют небольшие различия в

содержании элементов вторичной структуры, что не отразилось на физико-химических характеристиках и трипсинингибирующей активности rInhVJ.

3.5 Исследование биологической активности нативных и рекомбинантных пептидов

3.5.1 Определение трипсинингибирующей активности пептидов

Все полученные в данной работе нативные и рекомбинантные пептиды Кунитц-типа ингибировали активность трипсина. С целью уточнения количественных характеристик трипсинингибирующей активности для пептидов Кунитц-типа методом Диксона (Dixon, 1953) были установлены константы ингибирования (K_i) трипсина (показаны на сером фоне в таблице 8) (Gladkikh et al., 2015; Monastyrnaya et al., 2016; Sintsova et al., 2015, 2017).

Таблица 8 – Константы ингибирования трипсина пептидами Кунитц-типа

Источник	Пептид	Реактивный сайт	K_i , М	Ссылка
<i>Heteractis crista</i>	InhVJ(=HMGS2)	VGPCTAYFP	$7,4 \times 10^{-8}$	(Gladkikh et al., 2012)
	rInhVJ	VGPCTAYFP	$7,8 \times 10^{-8}$	
	APHC1	VGPCTAYFR	1×10^{-6}	(Andreev et al., 2008)
	APHC2	VGPCTAYFR	9×10^{-7}	(Kozlov et al., 2009)
	APHC3	VGPCTAYFP	5×10^{-7}	(Kozlov et al., 2009)
	HCRG1	VGPCCKAGLR	$2,8 \times 10^{-8}$	(Gladkikh et al., 2015)
	HCRG2(=HMRG1)	VGPCCKARIR	5×10^{-8}	(Gladkikh et al., 2015)
	rHCRG21	VGPCTAYFR	2×10^{-7}	(Monastyrnaya et al., 2016)
	rHCGS1.10	VGPCTAYLR	$2,1 \times 10^{-7}$	(Sintsova et al., 2017)
	rHCGS1.36	VGPCTAYFR	1×10^{-7}	(Sintsova et al., 2017)
	rHCGS1.19	VGRCRGSFP	3×10^{-8}	(Sintsova et al., 2017)
	rHCGS1.20	VGPCCKARIR	$2,1 \times 10^{-8}$	(Sintsova et al., 2015)
	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	$1,1 \times 10^{-10}$	(Delfin et al., 1996)
<i>Anthopleura elegantissima</i>	APEKTx1	QGFCRARFP	$1,2 \times 10^{-7}$	(Peigneur et al., 2011)
<i>Anemonia sulcata</i>	AsKC1	VGRCRASHP	$<3 \times 10^{-10}$	(Schweitz et al., 1995)
	AsKC2	VGRCRARHP		
	AsKC3	VGRCRARFP		
<i>Ornithoctonus huwena</i>	HWTX-XI	RGRCKASFE	$2,8 \times 10^{-10}$	(Jiang et al., 2014)
<i>Lychas mucronatus</i>	LmKTT-1a	VGKGKASFT	$1,4 \times 10^{-7}$	(Chen et al., 2012)
<i>Hadrurus gertschi</i>	Hg1	TGPCKGSFA	1×10^{-7}	(Chen et al., 2012)
<i>Bos taurus</i>	BPTI	TGPCKARII	6×10^{-14}	(Helland et al., 1999)

Значения K_i трипсина исследуемыми пептидами варьировали в диапазоне концентраций от 20 до 200 нМ, несмотря на наличие существенных замен в реактивном сайте, включая замену остатков в положении P1 реактивного сайта. На примере БПТИ было показано, что замена Lys/Arg на Thr в положении P1 приводит к увеличению K_i трипсина на 8 порядков, а именно с 10^{-14} до 10^{-6} М. (Рисунок 5) (Helland et al., 1999). Значения K_i трипсина исследуемыми пептидами с Lys или Arg в положении P1 оказались 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, APEKTx1, AsKC1–AsKC3, HWTX-XI, LmKTT-1a, Hg1), константы ингибирования трипсина исследуемыми пептидами отличаются на 1–2 порядка, как в меньшую, так и в большую сторону. Хотя в реактивном центре токсинов Hg1, LmKTT, APEKTx1 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 они приобрели функции токсинов и взаимодействуют с ионными каналами и рецепторами.

3.5.2 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.

Известно, что SHTXIII способен парализовать крабов ($ED_{50} = 183$ мкг/кг) (Honma et al., 2008), поэтому было проведено тестирование токсичности рекомбинантных пептидов rHCTX1, rSMTX1 и rSMTX1_A49E на ракообразных. Оказалось, что исследуемые пептиды не токсичны для крабов в концентрации до 5 мг/кг включительно.

3.5.3 Электрофизиологический анализ пептидов

Последовательности полученных пептидов, помимо большого процента идентичности с последовательностями модуляторов K_v и TRPV1, содержат аналогичные аминокислотные остатки в функционально значимых позициях. Кроме этого, все исследуемые пептиды с Lys и Arg в P1 положении ингибируют трипсин намного слабее, чем БПТИ, что может указывать на их неофункционализацию. Для определения спектра биологической активности нативных (HCRG1 и HCRG2) и рекомбинантных (rHCGS1.10, rHCGS1.36, rHCGS1.19, rHCGS1.20,

rHCRG21, rHCTX1, rSMTX1, rSMTX1_A49E) пептидов было изучено их влияние на активность восьми изоформ K_v ($K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v1.3$, $K_v1.4$, $K_v1.5$, $K_v1.6$, hERG, Shaker IR) и TRPV1, экспрессированных в ооцитах *X. laevis*. В результате электрофизиологических исследований было установлено, что два пептида, HCRG1 и HCRG2, блокируют проводимость K_v (Рисунок 32), а rHCRG21 является антагонистом TRPV1 (Рисунок 35).

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

Электрофизиологические исследования, проведенные на восьми изоформах потенциал-зависимых калиевых каналов, показали, что пептиды HCRG1 и HCRG2 ингибируют активность K_v млекопитающих ($K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v1.3$, $K_v1.6$) и насекомых (Shaker IR) (Рисунок 32, Таблица 9). Они являются первыми исследованными пептидами Кунитц-типа актиний, которые 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 (Рисунок 33).

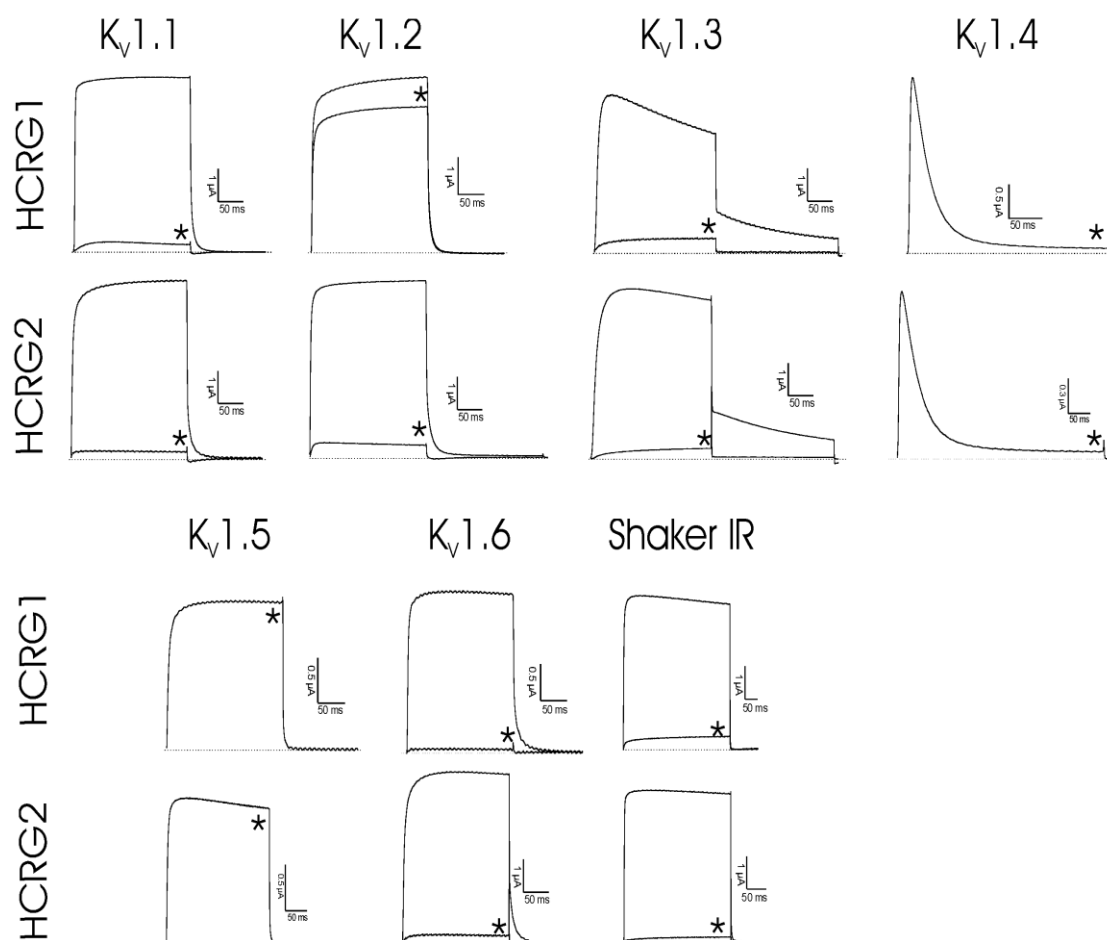


Рисунок 32 – (А) Электрофизиологический анализ модулирующего действия HCRG1 и HCRG2 на активность K_v , экспрессированных в ооцитах *X. laevis*. Результаты приведены на основании как минимум трех независимых экспериментов ($n \geq 3$). Звездочкой (*) отмечено состояние постоянного тока после добавления пептидов в концентрации 1 мкМ.

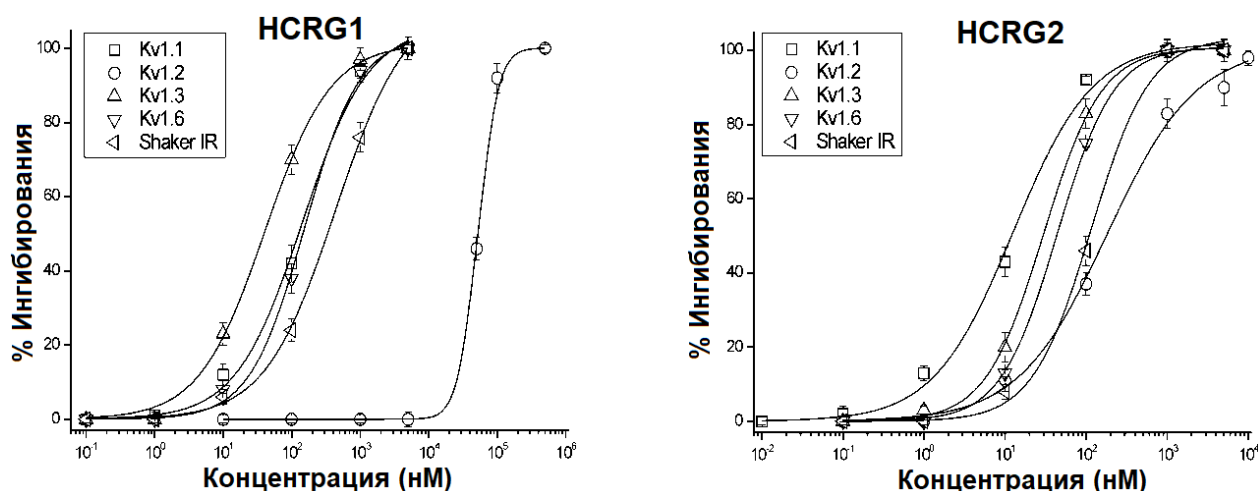


Рисунок 33 – Концентрационная зависимость влияния HCRG1 и HCRG2 на активность $K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v1.3$, $K_v1.6$ и Shaker IR. Представленные данные являются результатом как минимум трех независимых экспериментов ($n \geq 3$).

Таблица 9 – Концентрации полумаксимального ингибирования K_v пептидами Кунитц-типа ядовитых животных

Пептид	IC ₅₀ (нМ)					Ссылка
	$K_v1.1$	$K_v1.2$	$K_v1.3$	$K_v1.6$	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	-	(García-Fernández et al., 2016)
АРЕКТx1	0,9	-	-	-	-	(Peigneur et al., 2011)
AsKC1	-	2800	-	-	-	(Schweitz et al., 1995)
AsKC2	-	1100	-	-	-	(Schweitz et al., 1995)
AsKC3	-	1300	-	-	-	(Schweitz et al., 1995)
SHTXIII	-	270*	-	-	-	(Honma et al., 2008)
DTX-α	1.1	0,4	-	9	-	(Harvey, 2001)
DTX1	3.1	0,13	±	-	-	(Harvey, 2001)
DTX K	0,03	-	-	-	-	(Owen et al., 1997)
DTX-δ	0,01	±	-	-	-	(Imredy and MacKinnon, 2000)
Conk-S1	-	-	-	-	60	(Bayrhuber et al., 2005)
LmKTT-1a	-	-	>1000	-	-	(Chen et al., 2013)
Hg1	-	-	6,2	-	-	(Chen et al., 2012)
HWTX-XI	-	-	2,6×10 ⁵	-	-	(Jiang et al., 2014)

*По результатам анализа вытеснения I¹²⁵-DTX-α токсином SHTXIII (на каналах синаптосом крысы)

Было установлено, что HCRG1 блокирует $K_v1.3$ более избирательно, чем HCRG2 (Рисунок 33). Так, HCRG2 блокирует различные изоформы каналов в близком диапазоне концентраций, в то время как разница концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀) различных субтипов потенциал-зависимых калиевых каналов пептидом HCRG1 больше в 3–300 раз, чем для $K_v1.3$ (Таблица 9). Известно, что $K_v1.3$ участвует в патогенезе аутоиммунных и онкологических заболеваний (Felipe et al., 2012; Rangaraju et al., 2009).

Недавно группой Нортон Р.С. при проведении клинических испытаний было показано, что пептидный блокатор $K_v1.3$, ShK-186 из *S. helianthus*, безопасен и эффективен при лечении псориаза (Shen et al., 2017).

Среди известных токсинов Кунитц-типа, продуцируемых ядовитыми животными (Таблица 8, Рисунок 34), пептиды HCRG1 и HCRG2 оказались наименее селективны по отношению к изоформам $K_v1.x$ каналов. Токсины Кунитц-типа таких наземных ядовитых животных, как змеи и скорпионы, более селективны и, как правило, модулируют целевую изоформу K_v в меньших концентрациях. 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 новые физиологические эффекты, не связанные с модуляцией K_v , что также может являться результатом отбора и предоставлять определенное преимущество организму-продуценту. 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).

В последовательностях пептидов HCRG1 и HCRG2, в отличие от последовательностей пептидов AsKC1 и AsKC2 из актинии *A. sulcata* (Schweitz et al., 1995), отсутствуют функционально значимые для взаимодействия с K_v диады а.о. Lys5/Leu9, типичные для дендротоксинов змей (DTX1, DTX-K, DTX- α , DTX- δ) (Рисунок 34) (Harvey, 2001; Owen et al., 1997). Это свидетельствует о том, что функции данной диады могут распределяться между другими аминокислотными остатками молекулы, как предполагалось ранее для пептидов APEKTx1, SHTXIII и ShPI-1 актиний *A. elegantissima*, *S. haddoni* и *S. helianthus* соответственно (Рисунок 34) (García-Fernández et al., 2016; Peigneur et al., 2011). Функционально значимые аминокислотные остатки в последовательностях токсинов Кунитц-типа, выделенных из актиний и других ядовитых животных, расположены на N- и C-концевых участках молекулы, в частности вокруг Cys^I и Cys^V–Cys^{VI} соответственно (Рисунок 34) (García-Fernández et al., 2016). Данные аминокислотные остатки формируют поверхность 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 (Рисунок 34). Боковая цепь а.о. Arg1 также может вносить значительный вклад в связывание с K_v аналогично Arg5 пептида Hg1 и Arg4 пептидов DTX1 и DTX- α . Однако пептиды gHCGS1.19 и gHCGS1.20 имеют те же аминокислотные остатки, что и HCRG1, HCRG2 и

ShPI-1 в указанных позициях, но не проявляют модулирующей активности по отношению к K_v . По-видимому, в АП данных пептидов находятся остатки, затрудняющие взаимодействие с K_v или же делающие их специфичными к другим субтипам каналов. Аналогичная ситуация наблюдается для пептидов rHCTX1, rSMTX1 и rSMTX1_A49E, которые не блокируют K_v . Хотя их последовательности высокоидентичны (90%) последовательности пептида SHTXIII, блокирующего K_v , и обладают аналогичными а.о. в предположительно функционально значимых позициях (Рисунок 34). В дальнейшем с помощью структурно-функциональных исследований с привлечением метода сайт-направленного мутагенеза предстоит проверить значимость а.о. Arg1, Gly2, Ser5/Leu5, Pro7, Arg51, Gly52 пептидов HCRG1 и HCRG2 для взаимодействия с потенциал-зависимыми K^+ каналами.

	1	Cys ^I 10	P120	30	40	50	Cys ^V	Cys ^{VI}	68	%
HCRG1	----	RGICSEPKVVGPC	KAGLRRFY	YDSETG	ELPFIYGGCKGNKNNF	FETLHAC	RGICRA	-----	100	
HCRG2	----	RGICLEPKVVGPC	KARIRRFY	YDSETG	KCTPFIYGGCGNGN	NNFETLHAC	RGICRA	-----	87	
SHPI-1	----	SICSEPKKVGRC	KGYFFR	FYFDSETG	KCTPFIYGGCGNGN	NNFETLHQ	CRAICRA	-----	74	
HCGS 1.19	----	GSICLEPKKVGRC	RGSFPR	FYFDSETG	KCTPFIYGGCGNGN	NNFETLHAC	CRAICRA	-----	71	
HCGS 1.20	----	GSICLEPKKVGPC	KARIRRFY	YDSETG	KCTPFIYGGCGNGN	NNFETLHAC	CRAICRA	-----	80	
APEKTx1	---	INISICLLPKKQGF	CRARFF	RYNSSTR	RCMFY	YGGCGGN	NNFNTLEE	CEKVC	LGYEAWKAP	50
SHTXIII	TEEMP	ALCHLQ	PDVPKCRGY	FFRYYN	PEVGKCEQ	FIYGGCGGNKNNF	VSF	FEAC	CRATCI	IPL-----44
HCTX1	TEELP	ALCRLQ	PVAGKCRGY	FFRYYN	NPEVGKCEQ	FIYGGCGGNKNNF	ES	FEAC	CRATCI	IPL-----48
SMTX1	TEELP	ALCRLQ	PVVGKCRGY	FFRYYN	NPEAGKCEQ	FIYGGCGGNKNNF	AS	FEAC	CRATCI	IPL-----48
SMTX1A49E	TEELP	ALCRLQ	PVVGKCRGY	FFRYYN	NPEAGKCEQ	FIYGGCGGNKNNF	ES	FEAC	CRATCI	IPL-----50
AsKC1	---	INKDCLLP	MDVGR	CRASHPR	YYYN	SSSKRCEK	FIYGGCGGN	NNFHTLEE	CEKVC	GVR-----46
AsKC2	---	INKDCLLP	MDVGR	CRARHPR	YYYN	SSSRCEK	FIYGGCGGN	NNFITKKE	CEKVC	GVR-----44
AsKC3	---	INGDCLLP	KVVGRC	RARFFR	YYNLSSRRCEK	FIYGGCGGN	NNFHTLEE	CEKVC	GVR-----50	
DTX1	-QPLR	KLCIL	HRNPG	RCYQKIP	AFYYNQKKKQ	CEGFTWSG	CGGNSNR	FKTIEE	CRRT	CIRK-----42
DTX-α	-QPRR	KLCIL	HRNPG	RCYDKIP	AFYYNQKKKQ	CERFDWSG	CGGNSNR	FKTIEE	CRRT	CIG-----33
DTX K	---	AAKYCKL	PLRIG	PCKRKIP	SFYYKWAKQ	CLPFDYSG	CGGNAN	RFKTIEE	CRRT	CVG-----33
DTX-δ	---	AAKYCKL	PLRYG	PCKKKIP	SFYYKWAKQ	CLPFDYSG	CGGNAN	RFKTIEE	CRRT	CVG-----43
HWTX-XI	----	IDTCRLP	SDRGR	CKASFER	WYFNG--RTCA	KFIYGGCG	NGNKFPTQ	EACMKR	CAKA-----42	
Hg1	GHNH	RVNCLLP	PKTG	PKGSFA	RYFYFDIETG	SCKAFIYGG	CEGNSNNF	SEKHNC	ER	CRGFRKFGGK-----51
LmKTT-1a	----	KKCQLP	SDVG	GKGAFT	RYYYNEESGK	CETFIYGGV	GGNSNNFLT	KEDCC	RE	CAQGSC-----45
Conk-S1	-KDRP	SLCDLP	ADSG	SGTKAE	KRIYYNSARKQ	CLRF	DYTGQGGN	NNFRRTYD	CQRT	CLYT-----33
BPTI	---	RPDFCLE	PPYT	GPCKARI	IIFYNAKAGL	CQTEFVYGG	CRAKRNNF	KSAEDCM	RT	CGGA-----39
		*****					*****			
		Реактивный сайт					Сайт слабых взаимодействий			

Реактивный сайт

Сайт слабых взаимодействий

Рисунок 34 – Выравнивание АП пептидов Кунитц-типа блокаторов K_v и БПТИ (BPTI): APEKTx1 (P61541) из актинии *A. elegantissima* (Peigneur et al., 2011), AsKC1–AsKC3 (Q9TWG0, Q9TWF9, Q9TWF8) из актинии *A. sulcata* (Schweitz et al., 1995), ShPI-1 (P31713) из актинии *S. helianthus* (Delfin et al., 1996), SHTXIII (B1B5I8) из актинии *S. haddoni* (Honma et al., 2008), HCRG1, HCRG2, rHCGS1.19, rHCGS1.20, HCTX1 из актинии *H. crispa*, SMTX1, SMTX1A49E из *S. mertensii*, HWTX-XI (P68425) из паука *O. huwena* (Jiang et al., 2014), LmKTT-1a (P0DJ46) из скорпиона *L. mucronatus* (Chen et al., 2013), Hg1 (P0C8W3) из скорпиона *H. gertschi* (Chen et al., 2012), DTX1 (P00979), DTX-K (P00981) из змеи *D. polylepsis* (Harvey, 2001; Owen et al., 1997), DTX-α (P00980) из змеи *D. angusticeps* (Harvey, 2001), DTX-δ (P00982) из *D. angusticeps* (Imredy and MacKinnon, 2000), Conk-S1 (P0C1X2) из моллюска *C. striatus* (Bayrhuber et al., 2005); BPTI (P00974) из *B. taurus* (Helland et al., 1999). Идентичные а.о. показаны на темно-сером фоне, консервативные – на светло-сером. Гидрофобные остатки выделены зеленым, положительно заряженные – синим, отрицательно заряженные – красным, полярные не заряженные – розовым. Рамками выделены участки АП, отвечающие за взаимодействие с K_v .

3.5.3.2 Пептид HCRG21 – полный антагонист TRPV1

В данной работе был проведен электрофизиологический анализ модулирующего действия пептида гHCRG21 на активность TRPV1, экспрессированного в ооцитах *X. laevis* (Monastyrnaya et al., 2016). При добавлении 1 мкМ агониста, капсаицина, вызывающего активацию канала, фиксировали появление неселективных входящих токов, после чего к активированным каналам добавляли антагонист, капсазепин, что вызывало их закрытие и возвращение токов к нулевым значениям (Рисунок 35 А). Добавление гHCRG21 не влияло на функционирование TRPV1 и на его дальнейшую активацию капсаицином. Однако совместная аппликация капсаицина и 10 мкМ гHCRG21 приводила к ингибированию возникающих токов на $59,3 \pm 4,3\%$ (Рисунок 35 Б). Для определения количественных характеристик влияния гHCRG21 на проводимость TRPV1 было проведено тестирование активности пептида при его добавлении в различных концентрациях. Было установлено, что в концентрации 100 мкМ гHCRG21 ингибирует ток ионов на 95%, а в концентрации (IC_{50}) 6,9 мкМ наблюдается 50% ингибирование проводимости TRPV1 (Рисунок 35 В).

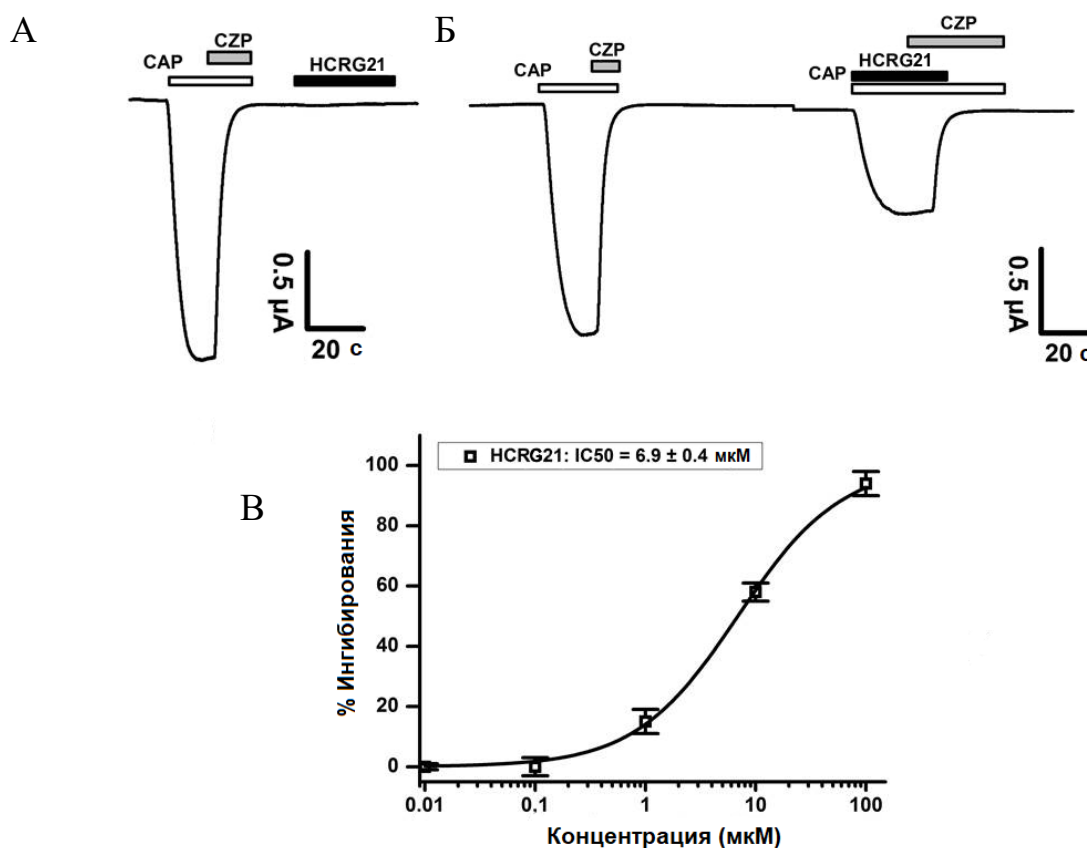


Рисунок 35 – Электрофизиологический анализ ингибирующего действия пептида гHCRG21 на активность TRPV1. (А) Оценка активности TRPV1 в контрольных условиях и в присутствии гHCRG21 (10 мкМ). (Б) Оценка активности TRPV1 при коаппликации с капсаицином (CAP) (2 мкМ) и пептидом гHCRG21 (10 мкМ). Капсазепин (CZP) (10 мкМ) использован в качестве стандартного антагониста. (В) Определение концентрационной зависимости ингибирующего действия гHCRG21 на активность TRPV1. Представленные данные являются результатом как минимум трех независимых экспериментов ($n \geq 3$).

Ингибирование тока ионов через TRPV1 пептидом APHC1 при концентрации 1 мкМ, изученное в аналогичных условиях, достигало 32%, а величина полумаксимальной эффективной концентрации (EC_{50}) составляла 54 ± 4 нМ (Andreev et al., 2008). Таким образом, гHCRG21 является первым полным пептидным антагонистом TRPV1. Действующие концентрации гHCRG21 оказались значительно выше, чем у APHC1, однако K_i трипсина пептидом гHCRG21 на порядок меньше, чем у APHC1 (Таблица 10).

Таблица 10 – Сравнение активности антагонистов TRPV1

Пептид	Ингибирование TRPV1, %	Концентрация, мкМ	K_i трипсина, мкМ	Ссылка
гHCRG21	50%	6,9	0,2	(Monastyrnaya et al., 2016)
	95%	100		
APHC1	16%	0,054	1	(Andreev et al., 2008)
	32%	1		

Разница в эффективности ингибирования токов через TRPV1 между гHCRG21 и APHC1 (95% и 32% ингибирования канала соответственно) обусловлена, по-видимому, различиями между функционально значимыми остатками в последовательностях пептидов. Ранее на основании экспериментальных данных и компьютерного моделирования было высказано предположение, что функционально значимыми для взаимодействия APHC1 с TRPV1 являются остатки Lys28, Glu45, Arg48, Arg51 и Arg55 (Рисунок 36) (Nikolaev et al., 2017). Эти же остатки сохраняются в последовательности HCRG21, за исключением Val31, который заменен на Pro31 (Рисунок 36).

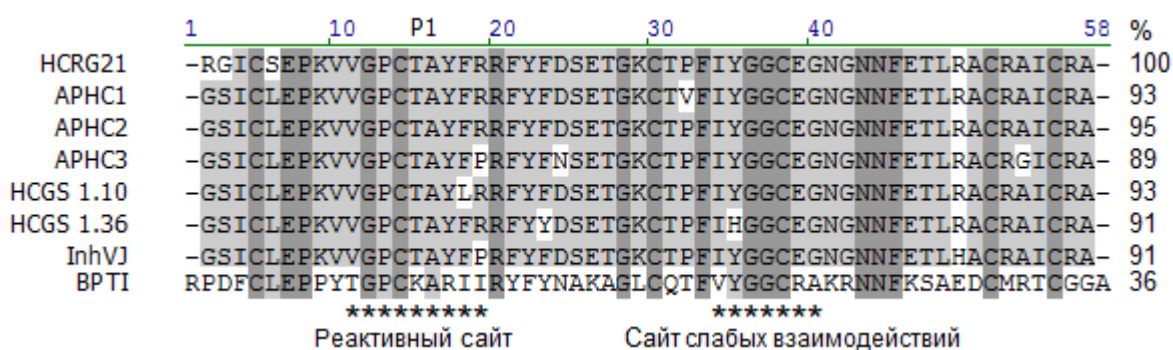


Рисунок 36 – Выравнивание АП пептидов Кунитц-типа актинии *H. crista* HCRG21, APHC1 (B2G331) (Andreev et al., 2008), APHC2 (C0HJF4) (Kozlov et al., 2009), APHC3 (C0HJF3) (Kozlov et al., 2009), InhVJ (P0DMJ5) (Gladkikh et al., 2012), HCGS1.10, HCGS1.36 (Isaeva et al., 2012) и BPTI (P00974) из *B. taurus* (Helland et al., 1999). Идентичные а.о. показаны на темно-сером фоне, консервативные – на светло-сером. Остаток P1 реактивного сайта пептидов Кунитц-типа указан над последовательностями.

Замена Val31Pro в молекуле HCRG21 приводит к конформационным изменениям (за счет структурного излома, обусловленного остатком пролина в АП), в результате которых формируется контактная поверхность, отличная от таковой APHC1. Замена Val31Pro может объяснить различия в эффективности действия пептидов APHC1 и HCRG21 на TRPV1

(Monastyrnaya et al., 2016), однако для подтверждения данных предположений требуется проведение структурно-функциональных исследований с привлечением сайт-направленного мутагенеза.

Точечные замены в АП пептидов HCGS1.10, HCGS1.36 обусловили отсутствие модулирующего эффекта на TRPV1. С другой стороны, данные пептиды могут быть направлены на взаимодействие с другими представителями семейства TRP или же могут усиливать активность антагонистов TRPV1. Такие закономерности были отмечены ранее для токсинов пауков и скорпионов (Herrmann et al., 1995; 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 TRP рецепторов.

Исследование взаимодействия нативных и рекомбинантных пептидов Кунитц-типа H. crispa и S. mertensii 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.

3.5.4 Противовоспалительная активность пептидов в моделях *in vitro*

3.5.4.1 Влияние пептидов на продукцию провоспалительных медиаторов

Процесс воспаления лежит в основе многих заболеваний. В случае поражения организма патогенными бактериями возникает септическое (микробное) воспаление, обусловленное интоксикацией организма липополисахаридами (ЛПС) бактерий. ЛПС, взаимодействуя со специфическими толл-подобными рецепторами (TLR) на поверхности иммунокомпетентных клеток, вызывает быструю ответную реакцию путем рекрутинга внутриклеточных сигнальных путей митоген-активируемых протеинкиназ (MAPKs) и ядерного фактора κB (NF- κB), в результате чего происходит активация NADPH-оксидазной системы, синтез и секреция индуцибельной NO синтазы, циклооксигеназы II и провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-6, ФНО- α , ИЛ-1 β , хемокины, интерфероны и противовоспалительный ИЛ-10 (O'Neill and Bowie, 2007). Поэтому для лечения и предупреждения процессов воспаления используют соединения, способные подавлять активность ферментов, индуцирующих их развитие, или ингибировать вовлеченные в них ионные каналы и рецепторы.

Было показано, что пептиды HCRG1 и HCRG2 способны подавлять синтез провоспалительных медиаторов, проИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α (Рисунок 37), индуцированный добавлением ЛПС *E. coli* в культуру макрофагов RAW 264.7 (Gladkikh et al., 2015). Данные эффекты могут достигаться за счет ингибирования протеиназ. Подобным действием обладает двудоменный ингибитор Кунитц-типа человека бикунин, ингибирующий продукцию тромбоксана Б2, ФНО- α и ИЛ-8 в макрофагах, обработанных ЛПС (Shigetomi et al., 2010). С другой стороны, блокирование K $_v$ 1.3 также приводит к снижению уровня экспрессии провоспалительных медиаторов. Так, ранее было обнаружено, что при обработке аутореактивных Т-лимфоцитов токсином ShK-186 актинии *S. helianthus* (блокатор K $_v$ 1.3) происходит значительное уменьшение экспрессии ИЛ-2 и интерферона- γ , а также менее выраженное уменьшение экспрессии ФНО- α и ИЛ-4 (Chi et al., 2012). Детали молекулярного механизма действия пептидов HCRG1 и HCRG2 предстоит выяснить в дальнейшем.

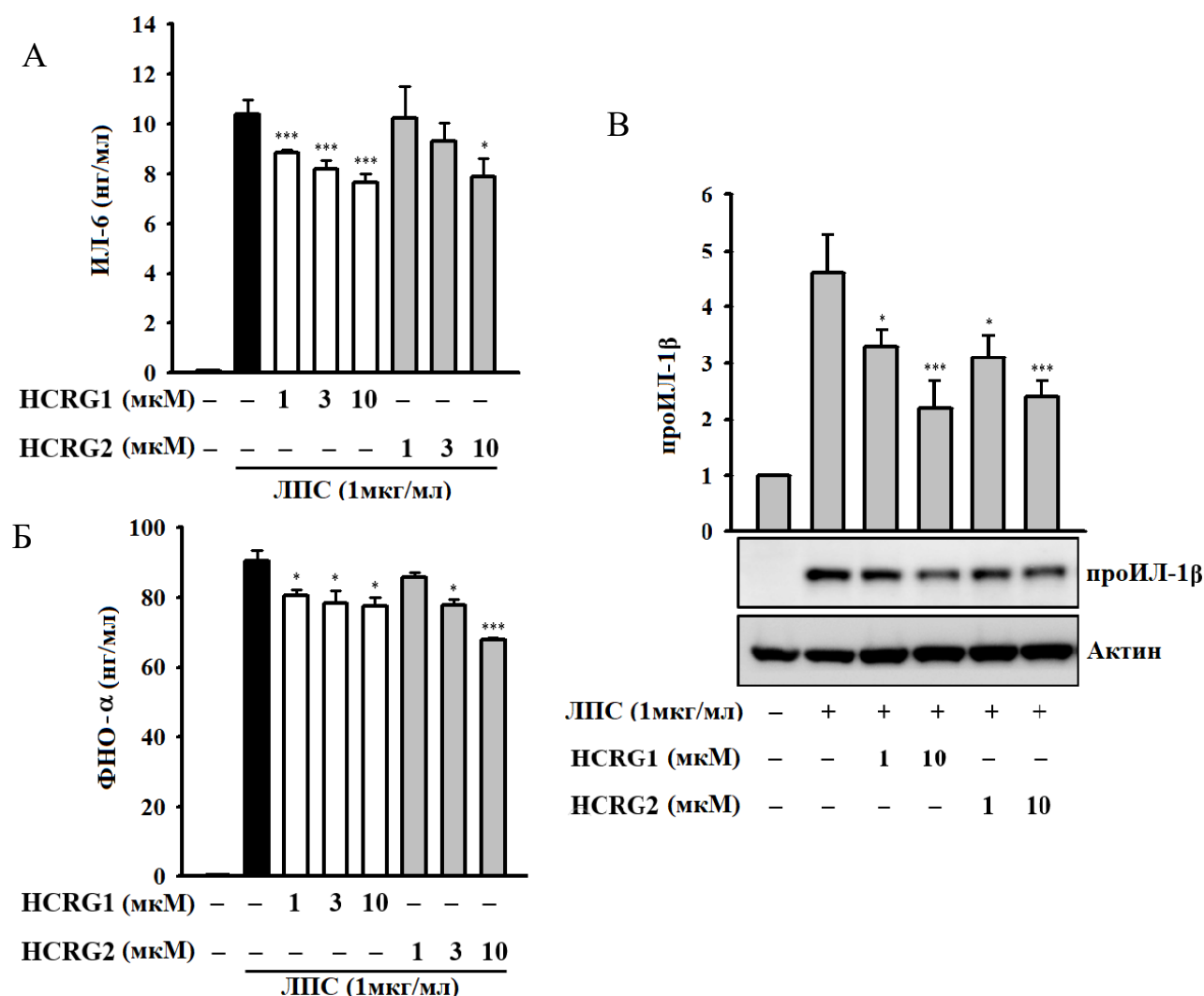


Рисунок 37 – Влияние пептидов HCRG1 и HCRG1 на образование ИЛ-6 (А) и ФНО- α (Б) в результате стимуляции макрофагов RAW 264.7 бактериальным ЛПС и на образование проИЛ-1 β (В) в результате стимуляции макрофагов J774A.1 бактериальным ЛПС. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (n=4). * p < 0,05, *** p < 0,001.

3.5.4.2 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 гHCGS1.10, гHCGS1.19, гHCGS1.20, гHCGS1.36 в концентрациях 0,01–10 мкМ достоверно понижало содержание АФК и NO (Sintsova et al., 2015) (Рисунок 38 А, Б), в том числе до контрольных значений. Среди исследуемых в работе SHTXIII-подобных пептидов наиболее эффективным и достоверным было действие гHCTX1 при концентрациях 0,1–10 мкМ. Концентрация АФК и NO в обработанных им макрофагах оставалась на уровне контроля или понижалась (Рисунок 38 В, Г).

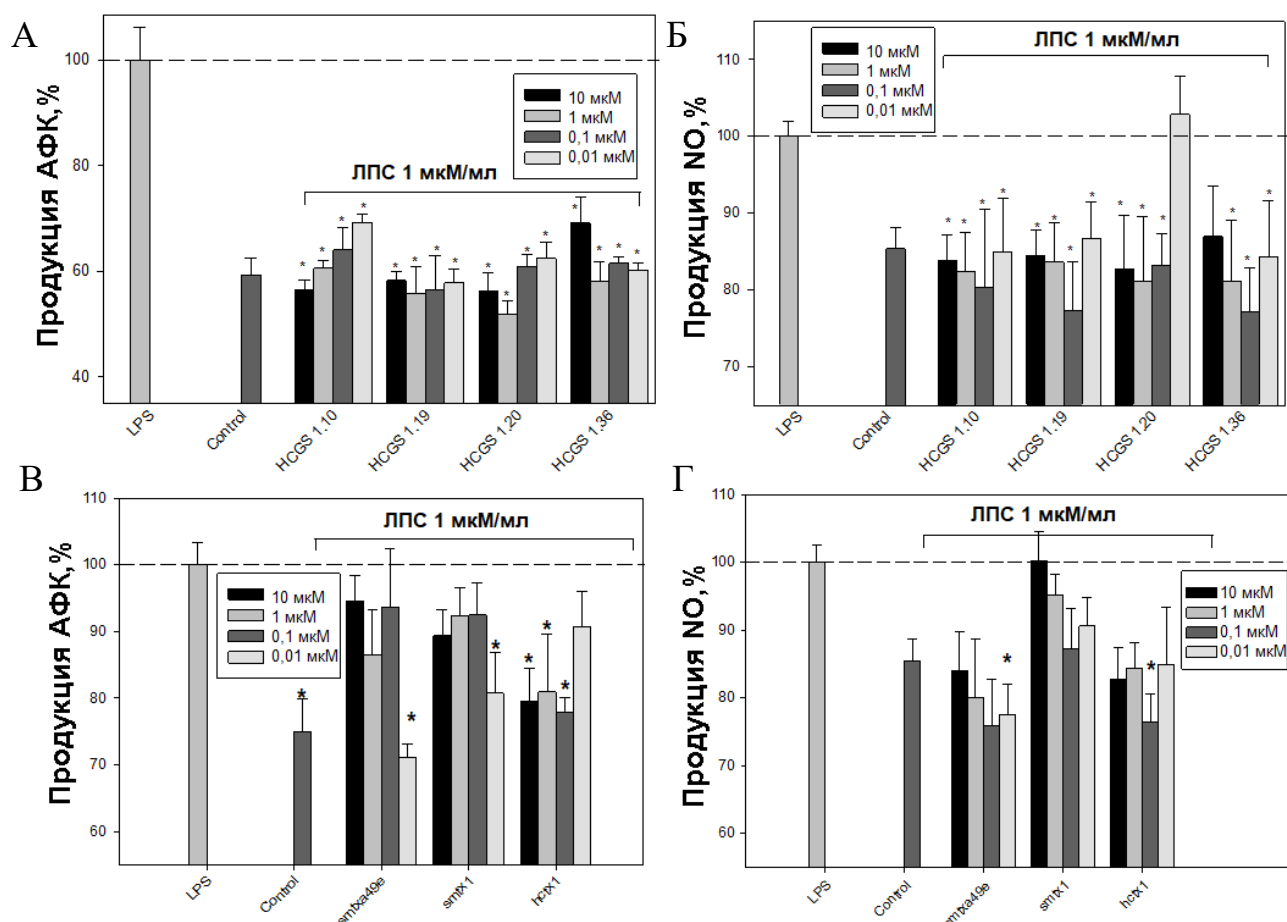


Рисунок 38 – Влияние пептидов на образование АФК (А, В) и NO (Б, Г) в результате стимуляции макрофагов RAW 264.7 бактериальным ЛПС (LPS 1 мкМ/мл). Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение ($n=4$). $*p < 0,05$.

Воспалительный процесс приводит к возникновению избытка АФК и развитию окислительного стресса, вызывающего повреждение компонентов клеточных мембран, белков и ДНК (Zhang et al., 2015). В связи с этим ингибиторы синтеза NO и АФК рассматривают в качестве цитопротекторов, уменьшающих негативные последствия острого и, в особенности, хронического воспалительного процесса, сопряженного с опухолевыми,

аутоиммунными и нейродегенеративными заболеваниями. Вероятно, исследуемые в данной работе пептиды Кунитц-типа ингибируют, подобно БПТИ, активность iNOS или же протеиназ, вовлеченных в воспалительный процесс (Beierlein et al., 2005; Day et al., 2006; Hill et al., 1997; Venturini et al., 1998).

3.5.4.3 Антигистаминная активность пептидов

Одним из начальных этапов при воспалениях различной этиологии, в том числе вызываемых ЛПС, является высвобождение гистамина из гранул тучных клеток. Физиологическое действие данного медиатора проявляется уже через несколько секунд после нанесения повреждения и приводит к быстрому развитию патологического процесса. В клеточных мембранах макрофагов экспрессируются в основном H1-гистаминовые рецепторы, относящиеся к семейству рецепторов, сопряженных с G-белками. При их активации происходит выход ионов Ca^{2+} из внутриклеточных депо в результате каскада реакций, приводящих к продукции в цитоплазме инозитол-1,4,5-трифосфата (Panula et al., 2013). В данной работе антигистаминную активность пептидов оценивали по их влиянию на внутриклеточную концентрацию ионов кальция $[\text{Ca}^{2+}]_i$. В экспериментах в качестве контроля использовали стандартный блокатор H1-гистаминовых рецепторов, фексофенадин, подавляющий кальциевый ответ клеток на гистамин. Было показано, что пептиды rHCGS1.19, rHCGS1.20, rHCGS1.36 (Рисунок 39 А) и rHCTX1 и rSMTX1_A49E (Рисунок 39 Б) в концентрациях 1 и 10 мкМ обладают достоверной антигистаминной активностью (Sintsova et al., 2015, 2017).

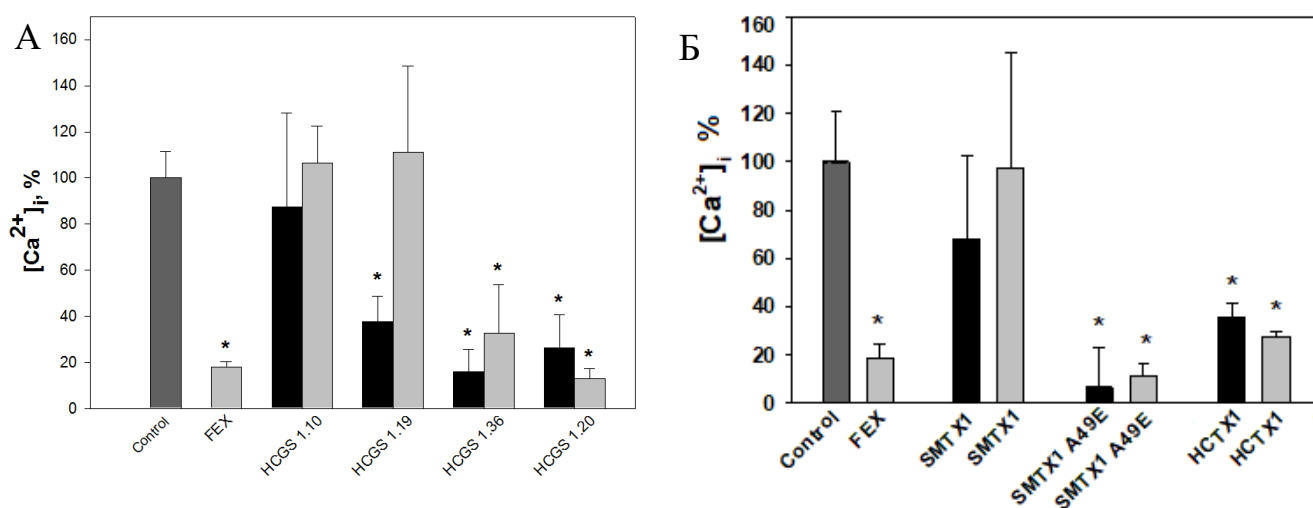


Рисунок 39 – Влияние гистамина (Control, 50 мкМ), фексофенадина (FEX, 10 мкМ) и пептидов (А) rHCGS1.10, rHCGS1.19, rHCGS1.20 и rHCGS1.36, (Б) rHCTX1, rSMTX1 и rSMTX1_A49E в концентрациях 10 мкМ (черные столбцы) и 1 мкМ (серые столбцы) на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в макрофагах костного мозга мыши. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (n=4). * $p < 0,05$.

Наиболее эффективными оказались пептиды rSMTX1_A49E и rHCGS1.20, в концентрации 1 мкМ они снижали выброс ионов Ca^{2+} на 85%. Данный эффект пептидов был равен эффекту фексофенадина. Ингибирование пептидами увеличения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в макрофагах под действием гистамина может являться результатом как блокирования H1-гистаминовых рецепторов, которое препятствует их взаимодействию с агонистом, так и следствием реакций, опосредованных взаимодействием пептидов с G-белками или ингибированием Ca_v каналов эндоплазматического ретикулума. На сегодняшний день известен лишь один пептид Кунитц-типа, модулирующий рецепторы, связанные с G-белками. Это мамбаквертин-1 из зеленой мамбы *D. angusticeps*, который является полным антагонистом рецептора вазопрессина второго типа (AVPR2) и эффективен при лечении поликистоза почек у экспериментальных животных (Ciolek et al., 2017). Из *D. angusticeps* также был выделен пептид Кунитц-типа, модулирующий проводимость Ca_v каналов L-типа – кальциклюдин (Stotz et al., 2000). Полученные данные позволяют рассматривать пептиды rHCTX1, rSMTX1_A49E, rHCGS1.19, rHCGS1.20, rHCGS1.36 в качестве потенциальных антигистаминных соединений, молекулярный механизм действия которых предстоит выяснить в дальнейшем.

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 исследуемых 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.

Заключение

Для лечения многих патологий, связанных с нарушением функционирования ионных каналов и протеиназ, необходимы их специфичные ингибиторы. В связи с этим поиск, выделение, установление структуры и исследование биологической активности пептидов Кунитц-типа актиний представляет значительный теоретический и практический интерес. В данной работе проведено комплексное исследование представителей мультигенного суперсемейства пептидов Кунитц-типа, продуцируемых морскими ядовитыми кишечнополостными, актиниями. Применение современных подходов белковой химии, биохимии, протеомики и молекулярной биологии позволило решить поставленные в данной работе задачи.

В результате протеомного анализа ядовитого секрета актинии *H. magnifica* установлено, что ингибиторы протеиназ Кунитц-типа являются, наряду с нейро- и α -пороформирующими токсинами, главным компонентом яда. Впервые показано, что пептиды Кунитц-типа актиний синтезируются в виде комбинаторной библиотеки, содержащей несколько основных (мажорных) изоформ и множество минорных. В ядовитом секрете актинии *H. magnifica* присутствуют две основные изоформы пептидов Кунитц-типа, идентичные основным изоформам пептидов *H. crispa*. Минорные изоформы представлены дивергентными группами и могут являться продуктом дупликации ортологичных и диверсификации паралогичных генов. По-видимому, большое разнообразие пептидов Кунитц-типа, предоставляемое комбинаторной библиотекой, обеспечивает выполнение функций, важных для успешного выживания актиний на протяжении сотен миллионов лет.

Анализ взаимодействия нативных и рекомбинантных пептидов Кунитц-типа с молекулярными мишенями (трипсин, K_v и TRPV1) показал, что все исследуемые пептиды являются слабыми ингибиторами трипсина, при этом у некоторых из них появились новые функции, а именно способность модулировать проводимость ионных каналов. Новые полифункциональные пептиды Кунитц-типа, модулирующие ионные каналы, могут найти применение в качестве инструментов исследования молекулярных основ функционирования потенциал-зависимых калиевых каналов и ионотропного рецептора TRPV1.

В моделях *in vitro* была исследована противовоспалительная активность ряда нативных и рекомбинантных пептидов. Показано, что пептиды Кунитц-типа актиний ингибируют синтез некоторых провоспалительных медиаторов, подавляют развитие

окислительного стресса в ЛПС-активированных макрофагах, а также блокируют действие гистамина. Таким образом, биологически активные пептиды Кунитц-типа актиний семейства *Stichodactylidae* перспективны в качестве прототипов фармакологических препаратов для лечения болевого синдрома и воспалительного процесса, сопровождающих многие заболевания.

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 литературы.

- Табакмахер, В.М., 2014. Структурно-функциональные взаимосвязи полипептидов Кунитц-типа актинии *Heteractis crispa*. дис. ...канд. хим. наук 02.00.10. Владивосток 1–140.
- Чаусова, В.Е., 2012. Полипептиды Кунитц-типа актинии *Heteractis crispa*: структура, функция и причины многообразия изоформ. дис. ...канд. хим. наук 02.00.10. Владивосток 1–128.
- Alexander, S.P., Catterall, W.A., Kelly, E., Marrion, N., Peters, J.A., Benson, H.E., Faccenda, E., Pawson, A.J., Sharman, J.L., Southan, C., Davies, J.A., CGTP Collaborators, 2015. The Concise Guide to Pharmacology 2015/16: Voltage-gated ion channels. Br. J. Pharmacol. 172, 5904–5941.
- Alonso-del-Rivero, M., Trejo, S.A., Reytor, M.L., Rodriguez-De-La-Vega, M., Delfin, J., Diaz, J., González-González, Y., Canals, F., Chavez, M.A., Aviles, F.X., 2012. Tri-domain bifunctional inhibitor of metallocarboxypeptidases A and serine proteases isolated from marine annelid *Sabellastarte magnifica*. J. Biol. Chem. 287, 15427–15438.
- Andreev, Y.A., Kozlov, S.A., Korolkova, Y. V., Dyachenko, I.A., Bondarenko, D.A., Skobtsov, D.I., Murashev, A.N., Kotova, P.D., Rogachevskaja, O.A., Kabanova, N. V., Kolesnikov, S.S., Grishin, E. V., 2013. Polypeptide modulators of TRPV1 produce analgesia without hyperthermia. Mar. Drugs. 11, 5100–5115.
- Andreev, Y.A., Kozlov, S.A., Koshelev, S.G., Ivanova, E.A., Monastyrnaya, M.M., Kozlovskaya, E.P., Grishin, E. V., 2008. Analgesic compound from sea anemone *Heteractis crispa* is the first polypeptide inhibitor of vanilloid receptor 1 (TRPV1). J. Biol. Chem. 283, 23914–23921.
- Andreev, Y.A., Kozlov, S.A., Vassilevski, A.A., Grishin, E. V., 2010. Cyanogen bromide cleavage of proteins in salt and buffer solutions. Anal. Biochem. 407, 144–146.
- Andreev, Y., Vassilevski, A., Kozlov, S., 2012. Molecules to Selectively Target Receptors for Treatment of Pain and Neurogenic Inflammation. Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov. 6, 35–45.
- Antonini, V., Pérez-Barzaga, V., Bampi, S., Pentón, D., Martínez, D., Serra, M.D., Tejuca, M., 2014. Functional characterization of sticholysin I and W111C mutant reveals the sequence of the actinoporin's pore assembly. PLoS One. 9(10), e110824.
- Arkett, S.A., Dixon, J., Yang, J.N., Sakai, D.D., Minkin, C., Sims, S.M., 1994. Mammalian osteoclasts express a transient potassium channel with properties of Kv1.3. Receptors Channels. 2, 281–293.
- Ascenzi, P., Bocedi, A., Bolognesi, M., Spallarossa, A., Coletta, M., De Cristofaro, R., Menegatti, E., 2003. The bovine basic pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz inhibitor): a milestone protein. Curr. Protein Pept. Sci. 4, 231–251.
- Báez, A., Salceda, E., Fló, M., Graña, M., Fernández, C., Vega, R., Soto, E., 2015. α -Dendrotoxin inhibits the ASIC current in dorsal root ganglion neurons from rat. Neurosci. Lett. 606, 42–47.

- Barros, F., Domínguez, P., de la Peña, P., 2012. Cytoplasmic domains and voltage-dependent potassium channel gating. *Front. Pharmacol.* 3 MAR, 1–15.
- Batista, I.F.C., Ramos, O.H.P., Ventura, J.S., Junqueira-de-Azevedo, I.L.M., Ho, P.L., Chudzinski-Tavassi, A.M., 2010. A new Factor Xa inhibitor from *Amblyomma cajennense* with a unique domain composition. *Arch. Biochem. Biophys.* 493, 151–156.
- Bayrhuber, M., Vijayan, V., Ferber, M., Graf, R., Korukottu, J., Imperial, J., Garrett, J.E., Olivera, B.M., Terlau, H., Zweckstetter, M., Becker, S., 2005. Conkunitzin-S1 is the first member of a new Kunitz-type neurotoxin family: Structural and functional characterization. *J. Biol. Chem.* 280, 23766–23770.
- Beckh, S., Pongs, O., 1990. Members of the RCK potassium channel family are differentially expressed in the rat nervous system. *EMBO J.* 9, 777–782.
- Beeton, C., Wulff, H., Standifer, N.E., Azam, P., Mullen, K.M., Pennington, M.W., Kolski-Andreaco, A., Wei, E., Grino, A., Counts, D.R., Wang, P.H., LeeHealey, C.J., S. Andrews, B., Sankaranarayanan, A., Homerick, D., Roeck, W.W., Tehranzadeh, J., Stanhope, K.L., Zimin, P., Havel, P.J., Griffey, S., Knaus, H.-G., Nepom, G.T., Gutman, G.A., Calabresi, P.A., Chandy, K.G., 2006. Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 17414–17419.
- Beierlein, W., Scheule, A.M., Dietrich, W., Ziemer, G., 2005. Forty years of clinical aprotinin use: A review of 124 hypersensitivity reactions. *Ann. Thorac. Surg.* 79, 741–748.
- Benishin, C.G., Sorensen, R.G., Brown, W.E., Krueger, B.K., Blaustein, M.P., 1988. Four polypeptide components of green mamba venom selectively block certain potassium channels in rat brain synaptosomes. *Mol. Pharmacol.* 34, 152–159.
- Nilius, B., Flockerzi, V., 2014. Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels. *Handb. Exp. Pharmacol.* 223, 795–826.
- Blow, D.M., Smith, J.M., 1975. Enzyme substrate and inhibitor interactions. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 272, 87–97.
- Brown, D.C., Iadarola, M.J., Perkowski, S.Z., Erin, H., Shofer, F., Laszlo, K.J., Olah, Z., Mannes, A.J., 2005. Physiologic and antinociceptive effects of intrathecal resiniferatoxin in a canine bone cancer model. *Anesthesiology.* 103, 1052–1059.
- Buczek, O., Koscielska-Kasprzak, K., Krowarsch, D., Dadlez, M., Otlewski, J., 2002. Analysis of serine proteinase-inhibitor interaction by alanine shaving. *Protein Sci.* 11, 806–819.
- Casewell, N.R., Wagstaff, S.C., Harrison, R.A., Renjifo, C., Wüster, W., 2011. Domain loss facilitates accelerated evolution and neofunctionalization of duplicate snake venom metalloproteinase toxin genes. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2637–2649.
- Casewell, N.R., Wüster, W., Vonk, F.J., Harrison, R.A., Fry, B.G., 2013. Complex cocktails: The evolutionary novelty of venoms. *Trends Ecol. Evol.* 28, 219–229.
- Cassoli, J.S., Verano-Braga, T., Oliveira, J.S., Montandon, G.G., Cologna, C.T., Peigneur, S., Pimenta, A.M. de C., Kjeldsen, F., Roepstorff, P., Tytgat, J., de Lima, M.E., 2013. The proteomic profile of *Stichodactyla duerdeni* secretion reveals the presence of a novel O-linked glycopeptide. *J. Proteomics.* 87, 89–102.

- Castañeda, O., Sotolongo, V., Amor, A.M., Stöcklin, R., Anderson, A.J., Harvey, A.L., Engström, A., Wernstedt, C., Karlsson, E., 1995. Characterization of a potassium channel toxin from the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon*. 33, 603–613.
- Cavanaugh, D.J., Chesler, A.T., Jackson, A.C., Sigal, Y.M., Yamanaka, H., Grant, R., O'Donnell, D., Nicoll, R.A., Shah, N.M., Julius, D., Basbaum, A.I., 2011. Trpv1 reporter mice reveal highly restricted brain distribution and functional expression in arteriolar smooth muscle cells. *J. Neurosci*. 31, 5067–5077.
- Chaki, S., Muramatsu, M., Ushiyama, Y., Otomo, S., 1992. Purification and partial characterization of K⁺ channel blockers from the venom of *Dendroaspis angusticeps*. *Neurochem. Int.* 20, 553–558.
- Chang, D., Duda, T.F., 2012. Extensive and continuous duplication facilitates rapid evolution and diversification of gene families. *Mol. Biol. Evol.* 29, 2019–2029.
- Chaousis, S., Smout, M., Wilson, D., Loukas, A., Mulvenna, J., Seymour, J., 2014. Rapid short term and gradual permanent cardiotoxic effects of vertebrate toxins from *Chironex fleckeri* (Australian box jellyfish) venom. *Toxicon*. 80, 17–26.
- Chen, Z., Luo, F., Feng, J., Yang, W., Zeng, D., Zhao, R., Cao, Z., Liu, M., Li, W., Jiang, L., Wu, Y., 2013. Genomic and Structural Characterization of Kunitz-Type Peptide LmKTT-1a Highlights Diversity and Evolution of Scorpion Potassium Channel Toxins. *PLoS One*. 8(4), e60201.
- Chen, Z.Y., Hu, Y.T., Yang, W.S., He, Y.W., Feng, J., Wang, B., Zhao, R.M., Ding, J.P., Cao, Z.J., Li, W.X., Wu, Y.L., 2012. Hg1, novel peptide inhibitor specific for Kv1.3 channels from first scorpion Kunitz-type potassium channel toxin family. *J. Biol. Chem.* 287, 13813–13821.
- Chi, V., Pennington, M.W., Norton, R.S., Tarcha, E.J., Londono, L.M., Sims-Fahey, B., Upadhyay, S.K., Lakey, J.T., Iadonato, S., Wulff, H., Beeton, C., Chandy, K.G., 2012. Development of a sea anemone toxin as an immunomodulator for therapy of autoimmune diseases. *Toxicon*. 59, 529–546.
- Choo, Y.M., Lee, K.S., Yoon, H.J., Qiu, Y., Wan, H., Sohn, M.R., Da Sohn, H., Jin, B.R., 2012. Antifibrinolytic role of a bee venom serine protease inhibitor that acts as a plasmin inhibitor. *PLoS One*. 7(2), e32269.
- Chudzinski-Tavassi, A.M., De-Sá-Júnior, P.L., Simons, S.M., Maria, D.A., de Souza Ventura, J., de Fátima Correia Batista, I., Faria, F., Durães, E., Reis, E.M., Demasi, M., 2010. A new tick Kunitz type inhibitor, Amblyomin-X, induces tumor cell death by modulating genes related to the cell cycle and targeting the ubiquitin-proteasome system. *Toxicon*. 56, 1145–1154.
- Ciolek, J., Reinfrank, H., Sigismeau, S., Mouillac, B., Peigneur, S., Tytgat, J., Droctov, L., Mourier, G., Pauw, E. De, Servent, D., Mendre, C., Nevoux, J., Lomb, M., Witzgall, R., Gilles, N., 2017. Green mamba peptide targets type-2 vasopressin receptor against polycystic kidney disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 4–9.
- Dai, S.-X., Zhang, A.-D., Huang, J.-F., 2012. Evolution, expansion and expression of the Kunitz/BPTI gene family associated with long-term blood feeding in *Ixodes Scapularis*. *BMC Evol. Biol.* 12, 4.
- Day, J.R.S., Landis, R.C., Taylor, K.M., 2006. Aprotinin and the protease-activated receptor 1 thrombin receptor: antithrombosis, inflammation, and stroke reduction. *Semin. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 10, 132–142.

- DeCoursey, T.E., Kim, S.Y., Silver, M.R., Quandt, F.N., 1996. Ion channel expression in PMA-differentiated human THP-1 macrophages. *J. Membr. Biol.* 152, 141–157.
- Delfin, J., Martinez, I., Antuch, W., Morera, V., Gonzalez, Y., Rodriguez, R., Marquez, M., Larionova, N., Diaz, J., Chavez, M., Saroyan, A., Padron, G., 1996. Purification, characterization and immobilization of proteinase inhibitors from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon*. 34, 1367–1376.
- Di Cera, E., 2009. Serine proteases. *IUBMB Life* 61, 510–515.
- Ding, L., Hao, J., Luo, X., Zhu, W., Wu, Z., Qian, Y., Hu, F., Liu, T., Ruan, X., Li, S., Li, J., Chen, Z., 2018. The Kv1.3 channel-inhibitory toxin BF9 also displays anticoagulant activity via inhibition of factor XIa. *Toxicon* 152, 9–15.
- Diochot, S., Baron, A., Rash, L.D., Deval, E., Escoubas, P., Scarzello, S., Salinas, M., Lazdunski, M., 2004. A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. *EMBO J.* 23, 1516–1525.
- Dixon, M., 1953. The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem. J.* 55, 170–171.
- Douglass, J., Osborne, P.B., Cai, Y.C., Wilkinson, M., Christie, M.J., Adelman, J.P., 1990. Characterization and functional expression of a rat genomic DNA clone encoding a lymphocyte potassium channel. *J. Immunol.* 144, 4841–4850.
- Eid, S.R., Crown, E.D., Moore, E.L., Liang, H. a, Choong, K.-C., Dima, S., Henze, D. a, Kane, S. a, Urban, M.O., 2008. HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. *Mol. Pain.* 4, 48.
- Esipov, R.S., Makarov, D.A., Stepanenko, V.N., Kostromina, M.A., Muravyova, T.I., Andreev, Y.A., Dyachenko, I.A., Kozlov, S.A., Grishin, E. V, 2017. Pilot Production of the Recombinant Peptide Toxin of *Heteractis crispa* as a Potential Analgesic by Intein-Mediated Technology. *Protein Expr. Purif.* 145, 71–76.
- ExPASy – ProtParam tool, URL <http://web.expasy.org/protparam/>
- Fautin, D.G., 2009. Structural diversity, systematics, and evolution of cnidae. *Toxicon*. 54, 1054–1064.
- Fehlhammer, H., Bode, W., 1975. The refined crystal structure of bovine beta-trypsin at 1.8 Å resolution. I. Crystallization, data collection and application of patterson search technique. *J. Mol. Biol.* 98, 683–692.
- Felipe, A., Bielanska, J., Comes, N., Vallejo, A., Roig, S., Cajal, S.R., Condom, E., Ferreres, J.C., 2012. Targeting the Voltage-Dependent K + Channels Kv1.3 and Kv1.5 as Tumor Biomarkers for Cancer Detection and Prevention. *Curr. Med. Chem.* 19(5), 661–674.
- Ferreira, L.G.B., Faria, R.X., 2016. TRPing on the pore phenomenon: what do we know about transient receptor potential ion channel-related pore dilation up to now? *J. Bioenerg. Biomembr.* 48, 1–12.
- Frazão, B., Vasconcelos, V., Antunes, A., 2012. Sea anemone (cnidaria, anthozoa, actiniaria) toxins: An overview. *Mar. Drugs*. 10, 1812–1851.
- Fry, B., 2005. From genome to “venome”: molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. *Genome Res.* 15, 403–420.

- Fry, B.G., Roelants, K., Champagne, D.E., Scheib, H., Tyndall, J.D. a, King, G.F., Nevalainen, T.J., Norman, J. a, Lewis, R.J., Norton, R.S., Renjifo, C., de la Vega, R.C.R., 2009. The toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 10, 483–511.
- Fry, B.G., Wuster, W., Kini, R.M., Brusic, V., Khan, A., Venkataraman, D., Rooney, A.P., 2003. Molecular Evolution and Phylogeny of Elapid Snake Venom Three-Finger Toxins. *J. Mol. Evol.* 57, 110–129.
- García-Fernández, R., Peigneur, S., Pons, T., Alvarez, C., González, L., Chávez, M.A., Tytgat, J., 2016. The kunitz-type protein ShPI-1 inhibits serine proteases and voltage-gated potassium channels. *Toxins (Basel)*. 8, 1–17.
- Gasparini, S., Danse, J.M., Lecoq, A., Pinkasfeld, S., Zinn-Justin, S., Young, L.C., De Medeiros, C.C.L., Rowan, E.G., Harvey, A.L., Ménez, A., 1998. Delineation of the functional site of α -dendrotoxin. *J. Biol. Chem.* 273, 25393–25403.
- Gendeh, G.S., Chung, M.C.M., Jeyaseelanah, K., 1997. Genomic structure of a potassium channel toxin from *Heteractis magnifica*. *FEBS Lett.* 418, 183–188.
- Gil, D.F., García-Fernández, R., Alonso-del-Rivero, M., Lamazares, E., Pérez, M., Varas, L., Díaz, J., Chávez, M.A., González-González, Y., Mansur, M., 2011. Recombinant expression of ShPI-1A, a non-specific BPTI-Kunitz-type inhibitor, and its protection effect on proteolytic degradation of recombinant human miniprotinsulin expressed in *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Res.* 11, 575–586.
- Gladkikh, I., Monastyrnaya, M., Leychenko, E., Zelepuga, E., Chausova, V., Isaeva, M., Anastyuk, S., Andreev, Y., Peigneur, S., Tytgat, J., Kozlovskaya, E., 2012. Atypical reactive center Kunitz-type inhibitor from the sea anemone *Heteractis crispa*. *Mar. Drugs*. 10, 1545–1565.
- Gladkikh, I., Monastyrnaya, M., Zelepuga, E., Sintsova, O., Tabakmakher, V., Gnedenko, O., Ivanov, A., Hua, K.-F., Kozlovskaya, E., 2015. New kunitz-type HCRG polypeptides from the sea anemone *Heteractis crispa*. *Mar. Drugs*. 13.
- Goldstein, S.A.N., Bayliss, D.A., Kim, D., Lesage, F., Plant, L.D., 2005. International Union of Pharmacology . LV . Nomenclature and Molecular Relationships of Two-P Potassium Channels. *Pharmacol Rev.* 57, 527–540.
- Gouin, O., L’Herondelle, K., Lebonvallet, N., Le Gall-Ianotto, C., Sakka, M., Buhé, V., Plée-Gautier, E., Carré, J.L., Lefeuvre, L., Misery, L., Le Garrec, R., 2017. TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization. *Protein Cell*. 8, 644–661.
- Grissmer, S., Dethlefs, B., Wasmuth, J.J., Goldin, A.L., Gutman, G.A., Cahalan, M.D., Chandy, K.G., 1990. Expression and chromosomal localization of a lymphocyte K⁺ channel gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 9411–9415.
- Grizel, A. V, Glukhov, G.S., Sokolova, O.S., 2014. Mechanisms of activation of voltage-gated potassium channels. *Acta Naturae*. 6, 10–26.
- Gutman, G.A., Chandy, K.G., Grissmer, S., Lazdunski, M., Mckinnon, D., Pardo, L.A., Robertson, G.A., Rudy, B., Sanguinetti, M.C., Stu, W., Wang, X., 2005. International Union of Pharmacology . LIII . Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels. *Pharmacol Rev.* 57, 473–508.

- Harvey, A.L., 2001. Twenty years of dendrotoxins. *Toxicon*. 39, 15–26.
- Harvey, A.L., Anderson, A.J., 1985. Dendrotoxins: snake toxins that block potassium channels and facilitate neurotransmitter release. *Pharmacol. Ther.* 31, 33–55.
- Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., Mackinnon, R., 1994. Mutations in the K⁺ Channel Signature Sequence. *Biophys. J.* 66(4), 1061–1067.
- Helland, R., Otlewski, J., Sundheim, O., Dadlez, M., Smalas, a O., 1999. The crystal structures of the complexes between bovine beta-trypsin and ten P1 variants of BPTI. *J. Mol. Biol.* 287, 923–942.
- Hellmich, U.A., Gaudet, R., 2014. High-resolution views of TRPV1 and their implications for the TRP channel superfamily. *Handb. Exp. Pharmacol.* 223, 991–1004.
- Herrmann, R., Moskowitz, H., Zlotkin, E., Hammock, B.D., 1995. Positive cooperativity among insecticidal scorpion neurotoxins. *Toxicon*. 33, 1099–1102.
- Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I.A.N., 2010. Inwardly Rectifying Potassium Channels : Their Structure, Function, and Physiological Roles. *Physiol. Rev.* 90(1), 291–366.
- Hill, G.E., Springall, D.R., Robbins, R.A., 1997. Aprotinin is associated with a decrease in nitric oxide production during cardiopulmonary bypass. *Surgery*. 121, 449–455.
- Hisada, M., Satake, H., Masuda, K., Aoyama, M., Murata, K., Shinada, T., Iwashita, T., Ohfune, Y., Nakajima, T., 2005. Molecular components and toxicity of the venom of the solitary wasp, *Anoplius samariensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 1048–1054.
- Honma, T., Kawahata, S., Ishida, M., Nagai, H., Nagashima, Y., Shiomi, K., 2008. Novel peptide toxins from the sea anemone *Stichodactyla haddoni*. *Peptides*. 29, 536–544.
- Hovnanian, A., 2013. Netherton syndrome: skin inflammation and allergy by loss of protease inhibition. *Cell Tissue Res.* 351, 289–300.
- Imredy, J.P., MacKinnon, R., 2000. Energetic and structural interactions between δ -dendrotoxin and a voltage-gated potassium channel. *J. Mol. Biol.* 296, 1283–1294.
- Isaeva, M.P., Chausova, V.E., Zelepuga, E.A., Guzev, K. V., Tabakmakher, V.M., Monastyrnaya, M.M., Kozlovskaya, E.P., 2012. A new multigene superfamily of Kunitz-type protease inhibitors from sea anemone *Heteractis crispa*. *Peptides*. 34, 88–97.
- J. Prentis, P., Pavasovic, A., S. Norton, R., 2018. Sea Anemones: Quiet Achievers in the Field of Peptide Toxins. *Toxins (Basel)*. 10, 36.
- Jiang, L., Deng, M., Duan, Z., Tang, X., Liang, S., 2014. Molecular cloning, bioinformatics analysis and functional characterization of HWTX-XI toxin superfamily from the spider *Ornithoctonus huwena*. *Peptides*. 54, 9–18.
- Jouiaei, M., Sunagar, K., Federman Gross, A., Scheib, H., Alewood, P.F., Moran, Y., Fry, B.G., 2015. Evolution of an ancient venom: Recognition of a novel family of cnidarian toxins and the common evolutionary origin of sodium and potassium neurotoxins in sea anemone. *Mol. Biol. Evol.* 32, 1598–1610.
- Juárez, P., Comas, I., González-Candelas, F., Calvete, J.J., 2008. Evolution of snake venom disintegrins by positive Darwinian selection. *Mol. Biol. Evol.* 25, 2391–407.

- Kaczmarek, L.K., Aldrich, R.W., Chandy, K.G., Grissmer, S., Wei, A.D., Wulff, H., 2017. International Union of Basic and Clinical Pharmacology . C . Nomenclature and Properties of Calcium-Activated and Sodium-Activated Potassium Channels. *Pharmacol Rev.* 69, 1–11.
- Kark, T., Bagi, Z., Lizanecz, E., Pásztor, E.T., Erdei, N., Czikora, A., Papp, Z., Edes, I., Pórszász, R., Tóth, A., 2008. Tissue-specific regulation of microvascular diameter: opposite functional roles of neuronal and smooth muscle located vanilloid receptor-1. *Mol. Pharmacol.* 73, 1405–1412.
- Kem, W.R., Parten, B., Pennington, M.W., Price, D.A., Dunn, B.M., 1989. Isolation, characterization, and amino acid sequence of a polypeptide neurotoxin occurring in the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry.* 28, 3483–3489.
- Khoo, K.S., Kam, W.K., Khoo, H.E., Gopalakrishnakone, P., Chung, M.C., 1993. Purification and partial characterization of two cytolytic toxins from a tropical sea anemone, *Heteractis magnifica*. *Toxicon.* 31, 1567–1579.
- Klumpp, D.J., Farber, D.B., Bowes, C., Song, E.J., Pinto, L.H., 1991. The potassium channel MBK1 (Kv1.1) is expressed in the mouse retina. *Cell. Mol. Neurobiol.* 11, 611–622.
- Kordiš, D., Gubenšek, F., 2000. Adaptive evolution of animal toxin multigene families. *Gene.* 261, 43–52.
- Kozlov, S., 2018. Animal toxins for channelopathy treatment. *Neuropharmacology.* 132, 83–97.
- Kozlov, S.A., Osmakov, D.I., Andreev, Y.A., Koshelev, S.G., Gladkikh, I.N., Monastyrnaya, M.M., Kozlovskaya, E.P., Grishin, E. V., 2012. A sea anemone polypeptide toxin inhibiting the ASIC3 acid-sensitive channel. *Russ. J. Bioorganic Chem.* 38, 578–583.
- Kozlov, S., Andreev, Y., Murashev, N., Skobtsov, D.I., D'iachenko, I., Grishin, E. V., 2009. New polypeptide components from the *Heteractis crispa* sea anemone with analgesic activity. *Bioorg. Khim.* 35, 789–798.
- Kozlov, S., Grishin, E., 2011. The mining of toxin-like polypeptides from EST database by single residue distribution analysis. *BMC Genomics.* 12, 88.
- Kozminsky-Atias, A., Bar-Shalom, A., Mishmar, D., Zilberberg, N., 2008. Assembling an arsenal, the scorpion way. *BMC Evol. Biol.* 8, 333.
- Krowarsch, D., Dadlez, M., Buczek, O., Krokoszynska, I., Smalas, A.O., Otlewski, J., 1999. Interscaffolding additivity: binding of P1 variants of bovine pancreatic trypsin inhibitor to four serine proteases. *J. Mol. Biol.* 289, 175–186.
- Kubo, Y., Adelman, J.P., Clapham, D.E., Jan, L.Y., Karschin, A., Kurachi, Y., Lazdunski, M., Nichols, C.G., Seino, S., Vandenberg, C.A., 2005. International Union of Pharmacology . LIV . Nomenclature and Molecular Relationships of Inwardly Rectifying Potassium Channels 57, 509–526.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874.
- Kunitz, M., Northrop, J.H., 1936. Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, a trypsin inhibitor, and an inhibitor-trypsin compound. *J. Gen. Physiol.* 19, 991–1007.
- Lancelin, J.M., Foray, M.F., Poncin, M., Hollecker, M., Marion, D., 1994. Proteinase inhibitor homologues as potassium channel blockers. *Nat. Struct. Biol.* 1, 246–250.

- Leanza, L., Henry, B., Sassi, N., Zoratti, M., Chandy, K.G., Gulbins, E., Szabò, I., 2012. Inhibitors of mitochondrial Kv1.3 channels induce Bax/Bak-independent death of cancer cells. *EMBO Mol. Med.* 4, 577–593.
- Leary, S., Underwood, W., Anthony, R., Cartner, S., 2013. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition, American Veterinary Medical Association.
- Leichenko, E. V., Monastirnyaya, M.M., Zelepuga, E.A., Tkacheva, E.S., Isaeva, M.P., Likhatskaya, G.N., Anastyuk, S.D., Kozlovskaya, E.P., 2014. Hct-a is a new actinoporin family from the *Heteractis crispa* sea anemone. *Acta Naturae.* 6, 89–98.
- Leicher, T., Bähring, R., Isbrandt, D., Pongs, O., 1998. Coexpression of the KCNA3B gene product with Kv1.5 leads to a novel A-type potassium channel. *J. Biol. Chem.* 273, 35095–35101.
- Lishko, P. V., Procko, E., Jin, X., Phelps, C.B., Gaudet, R., 2007. The Ankyrin Repeats of TRPV1 Bind Multiple Ligands and Modulate Channel Sensitivity. *Neuron.* 54, 905–918.
- Logashina, Y.A., Mosharova, I. V., Korolkova, Y. V., Shelukhina, I. V., Dyachenko, I.A., Palikov, V.A., Palikova, Y.A., Murashev, A.N., Kozlov, S.A., Stensvåg, K., Andreev, Y.A., 2017. Peptide from Sea Anemone *Metridium senile* Affects Transient Receptor Potential Ankyrin-repeat 1 (TRPA1) Function and Produces Analgesic Effect. *J. Biol. Chem.* 292(7), 2992–3004.
- Lomonte, B., Calvete, J.J., 2017. Strategies in “snake venomics” aiming at an integrative view of compositional, functional, and immunological characteristics of venoms. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 23, 26.
- Long, S.B., Campbell, E.B., Mackinnon, R., 2005. Crystal Structure of a Mammalian Voltage-Dependent Shaker Family K⁺ Channel. *Science.* 309(5736), 897–903.
- López-Otín, C., Bond, J.S., 2008. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J. Biol. Chem.* 283, 30433–30437.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Ma, H., Xiao-Peng, T., Yang, S.-L., Lu, Q.-M., Lai, R., 2016. Protease inhibitor in scorpion (*Mesobuthus eupeus*) venom prolongs the biological activities of the crude venom. *Chin. J. Nat. Med.* 14, 607–614.
- Madej, M.G., Ziegler, C.M., 2018. Dawning of a new era in TRP channel structural biology by cryo-electron microscopy. *Pflugers Arch.* 470(2), 213–225.
- Macrander, J., Broe, M., Daly, M., 2016. Tissue-Specific Venom Composition and Differential Gene Expression in Sea Anemones. *Genome Biol. Evol.* 8, 2358–2375.
- Mariottini, G.L., Pane, L., 2013. Cytotoxic and cytolytic cnidarian venoms. A review on health implications and possible therapeutic applications. *Toxins (Basel).* 6, 108–151.
- Marquart, M., Walter, J., Deisenhofer, J., Bode, W., Huber, R., IUCr, 1983. The geometry of the reactive site and of the peptide groups in trypsin, trypsinogen and its complexes with inhibitors. *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci.* 39, 480–490.
- Mercer, P.F., Deng, X., Chambers, R.C., 2007. Signaling pathways involved in proteinase-activated receptor1-induced proinflammatory and profibrotic mediator release following lung injury. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1096, 86–88.

MEROPS – the Peptidase Database URL <https://www.ebi.ac.uk/merops/>

- Metrione, R.M., Schweitz, H., Walsh, K.A., 1987. The amino acid sequence of toxin RpIII from the sea anemone, *Radianthus paumotensis*. FEBS Lett. 218, 59–62.
- Minagawa, S., Sugiyama, M., Ishida, M., Nagashima, Y., Shiomi, K., 2008. Kunitz-type protease inhibitors from acrorhagi of three species of sea anemones. Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol. 150, 240–245.
- Monastyrnaya, M., Leychenko, E., Isaeva, M., Likhatskaya, G., Zelepuga, E., Kostina, E., Trifonov, E., Nurminski, E., Kozlovskaya, E., 2010. Actinoporins from the sea anemones, tropical *Radianthus macrodactylus* and northern *Oulactis orientalis*: Comparative analysis of structure–function relationships. Toxicon. 56, 1299–1314.
- Monastyrnaya, M., Peigneur, S., Zelepuga, E., Sintsova, O., Gladkikh, I., Leychenko, E., Isaeva, M., Tytgat, J., Kozlovskaya, E., 2016. Kunitz-Type peptide HCRG21 from the sea anemone *Heteractis crispa* is a full antagonist of the TRPV1 receptor. Mar. Drugs. 14.
- Montgomery, L., Seys, J., Mees, J., 2016. To Pee , or Not to Pee : A Review on Envenomation and Treatment in European Jellyfish Species. Mar Drugs. 14.
- Moran, Y., Weinberger, H., Reitzel, A.M., Sullivan, J.C., Kahn, R., Gordon, D., Finnerty, J.R., Gurevitz, M., 2008a. Intron Retention as a Posttranscriptional Regulatory Mechanism of Neurotoxin Expression at Early Life Stages of the Starlet Anemone *Nematostella vectensis*. J. Mol. Biol. 380, 437–443.
- Moran, Y., Weinberger, H., Sullivan, J.C., Reitzel, A.M., Finnerty, J.R., Gurevitz, M., 2008b. Concerted evolution of sea anemone neurotoxin genes is revealed through analysis of the *Nematostella vectensis* genome. Mol. Biol. Evol. 25, 737–747.
- Nakagawa, H., Hiura, A., 2013. Four possible itching pathways related to the TRPV1 channel, histamine, PAR-2 and serotonin. Malaysian J. Med. Sci. 20, 5–12.
- Nei, M., Gu, X., Sitnikova, T., 1997. Evolution by the birth-and-death process in multigene families of the vertebrate immune system. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94, 7799–7806.
- Nikolaev, M. V., Dorofeeva, N.A., Komarova, M.S., Korolkova, Y. V., Andreev, Y.A., Mosharova, I. V., Grishin, E. V., Tikhonov, D.B., Kozlov, S.A., 2017. TRPV1 activation power can switch an action mode for its polypeptide ligands PLoS One. 5, 12(5):e0177077.
- Norton, R.S., Chandy, K.G., 2017. Venom-derived peptide inhibitors of voltage-gated potassium channels. Neuropharmacology. 127, 124–138.
- O'Neill, L.A.J., Bowie, A.G., 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. Nat. Rev. Immunol. 7, 353–364.
- Olivera, B.M., Walker, C., Cartier, G.E., Hooper, D., Santos, A.D., Schoenfeld, R., Shetty, R., Watkins, M., Bandyopadhyay, P., Hillyard, D.R., 1999. Speciation of cone snails and interspecific hyperdivergence of their venom peptides. Potential evolutionary significance of introns. Ann. N. Y. Acad. Sci. 870, 223–237.
- Osmakov, D.I., Kozlov, S.A., Andreev, Y.A., Koshelev, S.G., Sanamyan, N.P., Sanamyan, K.E., Dyachenko, I.A., Bondarenko, D.A., Murashev, A.N., Mineev, K.S., Arseniev, A.S., Grishin, E. V., 2013. Sea anemone peptide with uncommon β -hairpin structure inhibits acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) and reveals analgesic activity. J. Biol. Chem. 288, 23116–23127.

- Owen, D.G., Hall, A., Stephens, G., Stow, J., Robertson, B., 1997. The relative potencies of dendrotoxins as blockers of the cloned expressed in *Chinese hamster* ovary cells. *Br J Pharmacol.* 120(6), 1029–1034.
- Paesen, G.C., Siebold, C., Harlos, K., Peacey, M.F., Nuttall, P.A., Stuart, D.I., 2007. A Tick Protein with a Modified Kunitz Fold Inhibits Human Trypsin. *J. Mol. Biol.* 368, 1172–1186.
- Page, M.J., Di Cera, E., 2008. Serine peptidases: classification, structure and function. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 1220–1236.
- Panula, P., Chazot, P.L., Cowart, M., Gutzmer, R., Leurs, R., Wai, L.L.S., Stark, H., Robin, T.L., Haas, H.L., 2013. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVIII. Histamine Receptors. *Pharmacol Rev.* 67(3), 601–655.
- Peigneur, S., Billen, B., Derua, R., Waelkens, E., Debaveye, S., Béress, L., Tytgat, J., 2011. A bifunctional sea anemone peptide with Kunitz type protease and potassium channel inhibiting properties. *Biochem. Pharmacol.* 82, 81–90.
- Plant, L.D., Rajan, S., Goldstein, S.A.N., 2005. K2P channels and their protein partners *Curr Opin Neurobiol.* 15(3), 326–333.
- Provencher, S.W., Glöckner, J., 1981. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry.* 20, 33–37.
- Puente, X.S., Gutiérrez-Fernández, A., Ordóñez, G.R., Hillier, L.W., López-Otín, C., 2005. Comparative genomic analysis of human and chimpanzee proteases. *Genomics* 86, 638–647.
- Putnam, N.H., Srivastava, M., Hellsten, U., Dirks, B., Chapman, J., Salamov, A., Terry, A., Shapiro, H., Lindquist, E., Kapitonov, V. V., Jurka, J., Genikhovich, G., Grigoriev, I. V., Lucas, S.M., Steele, R.E., Finnerty, J.R., Technau, U., Martindale, M.Q., Rokhsar, D.S., 2007. Sea Anemone Genome Reveals Ancestral Eumetazoan Gene Repertoire and Genomic Organization. *Science.* 317(5834), 86–94.
- Ramachandran, R., Altier, C., Oikonomopoulou, K., Hollenberg, M.D., 2016. Proteinases, Their Extracellular Targets, and Inflammatory Signaling. *Pharmacol. Rev.* 68, 1110–1142.
- Ramezani, M., Burke da Silva, K., Sanderson, B., 2012. Differential susceptibilities of human lung, breast and skin cancer cell lines to killing by five sea anemone venoms. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 18, 157–163.
- Ramezani, M., da Silva, K.B., Sanderson, B.J.S., 2013. The effect of sea anemone (*H. magnifica*) venom on two human breast cancer lines: death by apoptosis. *Cytotechnology.* 66(5), 845–852.
- Rangaraju, S., Chi, V., Pennington, M.W., Chandy, K.G., 2009. Kv1.3 potassium channels as a therapeutic target in multiple sclerosis. *Expert Opin. Ther. Targets* 13, 909–924.
- Rao, V.R., Perez-Neut, M., Kaja, S., Gentile, S., 2015. Voltage-gated ion channels in cancer cell proliferation. *Cancers (Basel).* 7, 849–875.
- Rawlings, N.D., Tolle, D.P., Barrett, A.J., 2004. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem. J.* 378, 705–716.
- Roberds, S.L., Tamkun, M.M., 1991. Cloning and tissue-specific expression of five voltage-gated potassium channel cDNAs expressed in rat heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 1798–1802.

- Rodríguez, A.A., Cassoli, J.S., Sa, F., Dong, Z.Q., De Freitas, J.C., Pimenta, A.M.C., De Lima, M.E., Konno, K., Lee, S.M.Y., Garateix, A., Zaharenko, A.J., 2012. Peptide fingerprinting of the neurotoxic fractions isolated from the secretions of sea anemones *Stichodactyla helianthus* and *Bunodosoma granulifera*. New members of the APETx-like family identified by a 454 pyrosequencing approach. *Peptides*. 34, 26–38.
- Salkoff, L., Butler, A., Ferreira, G., Santi, C., Wei, A., 2006. High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nat Rev Neurosci*. 7(12), 921–931.
- Samejima, Y., Yanagisawa, M., Aoki-Tomomatsu, Y., Iwasaki, E., Ando, J., Mebs, D., 2000. Amino acid sequence studies on cytolytic toxins from sea anemone *Heteractis magnifica*, *Entacmaea quadricolor* and *Stichodactyla mertensii* (Anthozoa). *Toxicon*. 38, 259–264.
- Samways, D.S.K., Egan, T.M., 2011. Calcium-dependent decrease in the single-channel conductance of TRPV1. *Pflugers Arch. - Eur. J. Physiol*. 462, 681–691.
- Schweitz, H., Bidard, J.N., Frelin, C., Pauron, D., Vijverberg, H.P., Mahasneh, D.M., Lazdunski, M., Vilbois, F., Tsugita, A., 1985. Purification, sequence, and pharmacological properties of sea anemone toxins from *Radianthus paumotensis*. A new class of sea anemone toxins acting on the sodium channel. *Biochemistry*. 24, 3554–3561.
- Schweitz, H., Bruhn, T., Guillemare, E., Moinier, D., Lancelin, J.-M.M., Béress, L., Lazdunski, M., Beress, L., Lazdunski, M., Béress, L., Lazdunski, M., 1995. Kalicludines and Kaliseptine: Two different classes of sea anemone toxins for voltage sensitive K⁺ channels. *J. Biol. Chem*. 270, 25121–25126.
- Shen, B., Cao, Z., Li, W., Sabatier, J.-M., Wu, Y., 2017. Treating autoimmune disorders with venom-derived peptides. *Expert Opin. Biol. Ther*. 17, 1065–1075.
- Sheng, M., Tsaur, M.L., Jan, Y.N., Jan, L.Y., 1994. Contrasting subcellular localization of the Kv1.2 K⁺ channel subunit in different neurons of rat brain. *J. Neurosci*. 14, 2408–2417.
- Shigetomi, H., Onogi, A., Kajiwarra, H., Yoshida, S., Furukawa, N., Haruta, S., Tanase, Y., Kanayama, S., Noguchi, T., Yamada, Y., Oi, H., Kobayashi, H., 2010. Anti-inflammatory actions of serine protease inhibitors containing the Kunitz domain. *Inflamm. Res*. 59, 679–687.
- Shiomi, K., Honma, T., Ide, M., Nagashima, Y., Ishida, M., Chino, M., 2003. An epidermal growth factor-like toxin and two sodium channel toxins from the sea anemone *Stichodactyla gigantea*. *Toxicon*. 41, 229–236.
- Sintsova, O., Gladkikh, I., Chausova, V., Monastyrnaya, M., Anastyuk, S., Chernikov, O., Yurchenko, E., Aminin, D., Isaeva, M., Leychenko, E., Kozlovskaya, E., 2018. Peptide fingerprinting of the sea anemone *Heteractis magnifica* mucus revealed neurotoxins, Kunitz-type proteinase inhibitors and a new β -defensin α -amylase inhibitor. *J. Proteomics*. 173, 12–21.
- Sintsova, O.V., Monastyrnaya, M.M., Pislyagin, E.A., Menchinskaya, E.S., Leychenko, E.V., Aminin, D.L., Kozlovskaya, E.P., 2015. Anti-inflammatory activity of a polypeptide from the *Heteractis crispa* sea anemone. *Russ. J. Bioorganic Chem*. 41, 590–596.
- Sintsova, O. V, Pislyagin, E.A., Gladkikh, I.N., Monastyrnaya, M.M., Menchinskaya, E.S., 2017. Kunitz-Type Peptides of the Sea Anemone *Heteractis crispa*: Potential Anti-Inflammatory Compounds. *Russ. J. Bioorganic Chem*. 43, 91–97.

- Smith, L.A., Reid, P.F., Wang, F.C., Parcej, D.N., Schmidt, J.J., Olson, M.A., Dolly, J.O., 1997. Site-directed mutagenesis of dendrotoxin K reveals amino acids critical for its interaction with neuronal K⁺ channels. *Biochemistry*. 36, 7690–7696.
- Sobko, A., Peretz, A., Shirihai, O., Etkin, S., Cherepanova, V., Dagan, D., Attali, B., 1998. Heteromultimeric delayed-rectifier K⁺ channels in schwann cells: developmental expression and role in cell proliferation. *J. Neurosci*. 18, 10398–10408.
- Sokotun, I.N., Il'ina, A.P., Monastyrnaya, M.M., Leychenko, E. V., Es'kov, A.A., Anastuk, S.D., Kozlovskaya, E.P., 2007. Proteinase inhibitors from the tropical sea anemone *Radianthus macrodactylus*: isolation and characteristic. *Biochem*. 72, 301–306.
- Sommerhoff, C.P., Sollner, C., Mentele, R., Piechottka, G.P., Auerswald, E.A., Fritz, H., 1994. A Kazal-type inhibitor of human mast cell tryptase: isolation from the medical leech *Hirudo medicinalis*, characterization, and sequence analysis. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*. 375, 685–694.
- Sreerama, N., Woody, R.W., 2000. Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set. *Anal. Biochem*. 287, 252–260.
- Stabili, L., Schirosi, R., Parisi, M.G., Piraino, S., Cammarata, M., 2015. The mucus of *Actinia equina* (Anthozoa, Cnidaria): An unexplored resource for potential applicative purposes. *Mar. Drugs*. 13, 5276–5296.
- Stotz, S.C., Spaetgens, R.L., Zamponi, G.W., 2000. Block of voltage-dependent calcium channel by the green mamba toxin calcicludine. *J. Membr. Biol*. 174, 157–165.
- Stühmer, W., Ruppersberg, J.P., Schröter, K.H., Sakmann, B., Stocker, M., Giese, K.P., Perschke, A., Baumann, A., Pongs, O., 1989. Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium channels in mammalian brain. *EMBO J*. 8, 3235–3244.
- Sun, Z., Lu, W., Jiang, A., Chen, J., Tang, F., Liu, J.-N., 2009. Expression, purification and characterization of aprotinin and a human analogue of aprotinin. *Protein Expr. Purif*. 65, 238–243.
- Suri, A., Szallasi, A., 2008. The emerging role of TRPV1 in diabetes and obesity. *Trends Pharmacol. Sci*. 29, 29–36.
- Tirosh, Y., Linial, I., Askenazi, M., Linial, M., 2012. Short Toxin-like Proteins Abound in Cnidaria Genomes. *Toxins (Basel)*. 4, 1367–1384.
- Tsaur, M.L., Sheng, M., Lowenstein, D.H., Jan, Y.N., Jan, L.Y., 1992. Differential expression of K⁺ channel mRNAs in the rat brain and down-regulation in the hippocampus following seizures. *Neuron*. 8, 1055–1067.
- Tsujimoto, H., Kotsyfakis, M., Francischetti, I.M.B., Eum, J.H., Strand, M.R., Champagne, D.E., 2012. Simukunin from the salivary glands of the black fly *simulium vittatum* inhibits enzymes that regulate clotting and inflammatory responses. *PLoS One*. 7(2), e29964.
- Tysoe, C., Williams, L.K., Keyzers, R., Nguyen, N.T., Tarling, C., Wicki, J., Goddard-Borger, E.D., Aguda, A.H., Perry, S., Foster, L.J., Andersen, R.J., Brayer, G.D., Withers, S.G., 2016. Potent human α -amylase inhibition by the β -defensin-like protein helianthamide. *ACS Cent. Sci*. 2, 154–161.

- UniProt Knowledgebase – Basic Local Alignment Search Tool. URL <http://www.uniprot.org/blast/>
- Valcarcel, C.A., Dalla Serra, M., Potrich, C., Bernhart, I., Tejuca, M., Martinez, D., Pazos, F., Lanio, M.E., Menestrina, G., 2001. Effects of Lipid Composition on Membrane Permeabilization by Sticholysin I and II, Two Cytolysins of the Sea Anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biophys. J.* 80, 2761–2774.
- Valente, P., Garcia-Sanz, N., Gomis, A., Fernandez-Carvajal, A., Fernandez-Ballester, G., Viana, F., Belmonte, C., Ferrer-Montiel, A., 2008. Identification of molecular determinants of channel gating in the transient receptor potential box of vanilloid receptor I. *FASEB J.* 22, 3298–3309.
- Venturini, G., Colasanti, M., Ascenzi, P., 1998. Aprotinin, the first competitive protein inhibitor of NOS activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249, 263–265.
- Vicuña, L., Strohlic, D.E., Latremoliere, A., Bali, K.K., Simonetti, M., Husainie, D., Prokosch, S., Riva, P., Griffin, R.S., Njoo, C., Gehrig, S., Mall, M.A., Arnold, B., Devor, M., Woolf, C.J., Liberles, S.D., Costigan, M., Kuner, R., 2015. The serine protease inhibitor SerpinA3N attenuates neuropathic pain by inhibiting T cell-derived leukocyte elastase. *Nat. Med.* 21, 518–523.
- Vlachova, V., Teisinger, J., Susankova, K., Lyfenko, A., Ettrich, R., Vyklicky, L., 2003. Functional role of C-terminal cytoplasmic tail of rat vanilloid receptor 1. *J. Neurosci.* 23, 1340–1350.
- Wan, H., Lee, K.S., Kim, B.Y., Zou, F.M., Yoon, H.J., Je, Y.H., Li, J., Jin, B.R., 2013. A Spider-Derived Kunitz-Type Serine Protease Inhibitor That Acts as a Plasmin Inhibitor and an Elastase Inhibitor. *PLoS One.* 8(1), e53343.
- Wang, F.C., Bell, N., Reid, P., Smith, L.A., McIntosh, P., Robertson, B., Dolly, J.O., 1999. Identification of residues in dendrotoxin K responsible for its discrimination between neuronal K⁺ channels containing Kv1.1 and 1.2 alpha subunits. *Eur. J. Biochem.* 263, 222–229.
- Wang, H., Wang, L., Zhou, M., Yang, M., Ma, C., Chen, T., Zhang, Y., Zeller, M., Hornshaw, M., Shaw, C., 2012. Functional peptidomics of amphibian skin secretion: A novel Kunitz-type chymotrypsin inhibitor from the African hyperoliid frog, *Kassina senegalensis*. *Biochimie.* 94, 891–899.
- Wang, Y., Chua, K.L., Khoo, H.E., 2000. A new cytolysin from the sea anemone, *Heteractis magnifica*: isolation, cDNA cloning and functional expression. *Biochim. Biophys. Acta.* 1478, 9–18.
- Wang, Y., Yap, L.L., Chua, K.L., Khoo, H.E., 2008. A multigene family of *Heteractis magnificolysins* (HMgs). *Toxicon* 51, 1374–1382.
- Wei, A.D., Gutman, G.A., Aldrich, R., Chandy, K.G., Grissmer, S., Wulff, H., 2005. International Union of Pharmacology . LII . Nomenclature and Molecular Relationships of Calcium-Activated Potassium Channels. *Pharmacol Rev.* 57(4), 463–472.
- Weinberger, H., Moran, Y., Gordon, D., Turkov, M., Kahn, R., Gurevitz, M., 2010. Positions under positive selection-key for selectivity and potency of scorpion α -toxins. *Mol. Biol. Evol.* 27, 1025–1034.
- Wray, D., 2004. The roles of intracellular regions in the activation of voltage-dependent potassium channels. *Eur. Biophys. J.* 33, 194–200.

- Wullschlegel, B., Kuhn-Nentwig, L., Tromp, J., Kämpfer, U., Schaller, J., Schürch, S., Nentwig, W., 2004. CSTX-13, a highly synergistically acting two-chain neurotoxic enhancer in the venom of the spider *Cupiennius salei* (Ctenidae). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 11251–6.
- Yamaguchi, Y., Hasegawa, Y., Honma, T., Nagashima, Y., Shiomi, K., 2010. Screening and cDNA cloning of Kv1 potassium channel toxins in sea anemones. *Mar. Drugs*. 8, 2893–2905.
- Yang, F., Zheng, J., Yang, F., Cui, Y., Wang, K., Zheng, J., 2010. Thermosensitive TRP channel pore turret is part of the temperature activation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107(15), 7083–7088.
- Yiangou, Y., Facer, P., Dyer, N.H., Chan, C.L., Knowles, C., Williams, N.S., Anand, P., 2001. Vanilloid receptor 1 immunoreactivity in inflamed human bowel. *Lancet* (London, England). 357, 1338–1339.
- Yu, F.H., Catterall, W.A., 2004. The VGL-Chanome: A Protein Superfamily Specialized for Electrical Signaling and Ionic Homeostasis. *Sci STKE*. 2004(253), re15.
- Yu, F.H., Yarov-Yarovoy, V., Gutman, G.A., Catterall, W.A., 2005. Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacol. Rev.* 57, 387–395.
- Yuan, C.H., He, Q.Y., Peng, K., Diao, J.B., Jiang, L.P., Tang, X., Liang, S.P., 2008. Discovery of a distinct superfamily of kunitz-type toxin (KTT) from Tarantulas. *PLoS One*. 3(10), e3414.
- Zaharenko, A.J., Ferreira, W.A., Oliveira, J.S., Richardson, M., Pimenta, D.C., Konno, K., Portaro, F.C. V, de Freitas, J.C., 2008. Proteomics of the neurotoxic fraction from the sea anemone *Bunodosoma cangicum* venom: Novel peptides belonging to new classes of toxins. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics*. 3, 219–225.
- Zhang, L., Shi, W., Zeng, X.C., Ge, F., Yang, M., Nie, Y., Bao, A., Wu, S., E, G., 2015. Unique diversity of the venom peptides from the scorpion *Androctonus bicolor* revealed by transcriptomic and proteomic analysis. *J. Proteomics*. 128, 231–250.
- Zhang, Y., Bi, X., Jiang, F., 2015. Cytotoxin-induced NADPH oxides activation: roles in regulation of cell death. *Arch. Toxicol.* 89, 991–1006.
- Zhou, Y., Morais-Cabral, J.H., Kaufman, A., MacKinnon, R., 2001. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature*. 414, 43–48.
- Zhu, S., Peigneur, S., Gao, B., Luo, L., Jin, D., Zhao, Y., Tytgat, J., 2011. Molecular diversity and functional evolution of scorpion potassium channel toxins. *Mol. Cell. Proteomics Mol Cell Proteomics*. 10(2), M110.002832.
- Župunski, V., Kordiš, D., Gubenšek, F., 2003. Adaptive evolution in the snake venom Kunitz/BPTI protein family. *FEBS Lett.* 547, 131–136.
- Zykova, T.A., Kozlovskaya, E.P., 1989. Amino acid sequence of a neurotoxin from the anemone *Radianthus macrodactylus*. *Bioorg. Khim.* 15, 1301–1306.
- Zykova, T.A., Kozlovskaya, E.P., Eliakov, G.B., 1988. Amino acid sequence of neurotoxin II from the sea anemone *Radianthus macrodactylus*. *Bioorg. Khim.* 14, 878–882.
- Zykova, T.A., Vinokurov, L.M., Markova, L.F., Kozlovskaya, E.P., Elyakov, G.B., 1985. Amino-acid sequence of trypsin inhibitor IV from *Radianthus macrodactylus*. *Bioorg. Khim.* 11, 293–301.