



УДК 577.112.083

НОВЫЕ ПОЛИПЕПТИДНЫЕ КОМПОНЕНТЫ С АНАЛЬГЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ ИЗ МОРСКОЙ АНЕМОНЫ *Heteractis crispa*

© 2009 г. С. А. Козлов**, Я. А. Андреев*, А. Н. Мурашев**, Д. И. Скобцов**, И. А. Дьяченко**, Е. В. Гришин*

*Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

**Филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Московская обл., г. Пущино

Поступила в редакцию 09.04.2009 г. Принята к печати 29.04.2009 г.

Из морской тропической анемоны *Heteractis crispa* комбинацией различных методов хроматографии выделены два новых полипептидных компонента, проявляющих обезболивающий эффект в экспериментах на мышах. Новые полипептиды АРНС2 и АРНС3 состоят из 56 а.о. с шестью цистеинами. Их полная аминокислотная последовательность была получена по результатам секвенирования методом Эдмана, масс-спектрометрии и пептидного картирования. Анализ первичной структуры полипептидов позволил отнести их к обширной группе ингибиторов трипсина Кунитца-типа. Интересной биологической функцией новых полипептидов является их анальгетическое действие на млекопитающих, которое, предположительно, осуществляется за счет модулирования активности рецептора TRPV1, а не за счет остаточной ингибирующей активности по отношению к трипсину и химотрипсину. Анальгетическая активность полипептида АРНС3, измеренная на модели острой боли "горячая пластина", была значительно выше активности АРНС2. Для обоих полипептидов были разработаны методы получения рекомбинантных аналогов.

Ключевые слова: морская анемона *Heteractis crispa*; полипептидные ингибиторы типа Кунитца, структура, анальгетическая активность; функциональная экспрессия.

ВВЕДЕНИЕ

Морские анемоны, одни из самых древних хищных животных на земле, распространены преимущественно в теплых морских водах и ведут малоактивный образ жизни, медленно перемещаясь по морскому дну. Анемоны охотятся на мелких рыб, ракообразных и моллюсков, обездвигивая их при помощи стрекательных клеток, расположенных на щупальцах вокруг ротового отверстия. При воздействии на человека эти клетки могут вызвать зуд и жжение, а в месте контакта также возможен некроз тканей. В основном это связано с цитотоксическим действием основных компонентов ядов – цитолизина, на мембраны клеток млекопитающих [1]. Помимо мембранолитических компонентов, в ядах анемоны был обнаружен целый ряд полипептидов с разнообразной биологической активностью. Прежде всего, это нейротоксины,

способные при низких концентрациях вызывать паралич потенциальных жертв.

Из экстрактов анемоны были выделены и охарактеризованы многочисленные полипептидные токсины, селективно взаимодействующие с сайтом 3 узнавания Na^+ -каналов (замедляющие кинетику инактивации канала). Характерные особенности первичной структуры позволили выделить три типа блокаторов Na^+ -каналов [2, 3]. Первые два типа составляют токсины длиной 40–50 а.о., а токсины третьего типа более короткие – 27–32 а.о. По своей физиологической активности они более специфичны по отношению к Na^+ -каналам ракообразных и насекомых, чем к каналам млекопитающих [4]. Усилению паралитического эффекта способствуют продуцируемые анемонами блокаторы K^+ -каналов. Эти полипептидные токсины, подобно цитолитическим компонентам, также разделяются на четыре структурные группы [2, 5]. Первый тип включает токсины BgK и ShK [6, 7], длиной в 35–37 а.о. с тремя дисульфидными связями; второй тип объединяет полипептидные токсины каликлюдии [8], структурные гомологи ингибиторов протеиназы типа Кунитца; к третьему типу относятся блокаторы BDS-I и BDS-II длиной в 40 а.о., обладающие структурным сходством с токсинами анемоны, влияющими на Na^+ -

Сокращения: ASIC – протончувствительный канал; ВРП1 – бычий панкреатический ингибитор трипсина (bovine pancreatic trypsin inhibitor); TRPV1 – ваниллоидный рецептор 1; IPTG – изопропил- β -D-1-тиогаляктопиранозид; TFA – трифторуксусная кислота; EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота.

Автор для связи (тел.: (495) 336-65-40; факс: (495) 330-73-01; эл. почта: serg@ibch.ru).

каналы [9]. Наконец, самые небольшие токсины длиной в 28 а.о. с 2 дисульфидными связями, SHTX I и SHTX II [10], относятся к четвертому типу.

Кроме токсических компонентов анемоны способны продуцировать небольшие полипептидные молекулы, не вызывающие гибель или паралич жертв. Так, например, из различных видов анемоны были выделены ингибиторы протеолитических ферментов [11–13]. Для токсинов и пептидных ингибиторов характерна одинаковая пространственная укладка. Кроме того, каликлюдины 1–3 [8] и ингибитор протеиназ SHTX III [10] проявляют ингибирующую активность в отношении как потенциалактивируемых K^+ -каналов, так и сериновых протеиназ.

Помимо нейтральных и токсичных компонентов анемоны продуцируют полипептидные компоненты с обезболивающим действием. По-видимому, это связано с тем, что генерируемая ими природная комбинаторная библиотека полипептидов направлена на максимально возможное воздействие на любые типы нейрональных и мышечных ионотропных рецепторов. Блокирование или изменение характеристик проведения сигнала (модулирование действия) ряда таких рецепторов приводит к анальгетическому эффекту. Эффект обезболивания при введении полипептидов анемоны на животных моделях наблюдали для APETx1 – селективного блока протончувствительных каналов ASIC3 [14] и для APHC1 – модулятора активности ваниллоидного рецептора TRPV1 [15].

В настоящей работе приводятся данные о структуре и биологической активности двух новых полипептидных компонентов, выделенных из спиртового экстракта морской анемоны *Heteractis crispa*, проявляющих обезболивающий эффект.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что ионотропные рецепторы TRPV1 принимают прямое участие в механизмах восприятия передачи болевой сигналы. Так, эксперименты с нокаутными мышами показали, что отсутствие этого рецептора приводит к значительному повышению порога болевой чувствительности к тепловым и воспалительным стимулам [16]. Антагонисты TRPV1, по-видимому, могут облегчать боль при ряде патологических состояний организма. Исследования низкомолекулярных ингибиторов TRPV1 подтверждают, что фармакологическая блокада этого рецептора может быть использована в терапии болей, возникающих при воспалении, раке и нейропатии [17, 18]. В первую очередь поиск новых анальгетических компонентов из экстрактов анемоны был ориентирован на выделение ингибиторов рецептора TRPV1.

Полипептидные компоненты с анальгетической активностью были выделены из спиртовой фракции тропического вида анемоны *H. crispa* комбина-

цией методов жидкостной хроматографии. Предварительные стадии разделения гидрофобной хроматографией на Полихроме-1 и ионообменной хроматографией на колонках Bio-Rex 70 и SP-Sephadex G-25 соответствовали ранее описанным [19], использовавшимся при выделении модулятора ваниллоидного рецептора APHC1. Тогда же в электрофизиологических экспериментах была замечена незначительная ингибирующая активность мионорной фракции, элюирующейся после основного активного компонента, на капсаицинининдуцируемый ток через каналы TRPV1. Для идентификации активных компонентов этой фракции, полученной после ионообменной хроматографии на SP-Sephadex G-25, применяли обращенно-фазовую ВЭЖХ (рис. 1). Первоначальное хроматографическое разделение в кислых буферных системах, содержащих 0.1% TFA (данные не приводятся), оказалось неэффективным, поэтому мы использовали нейтральные значения pH буферных растворов, что позволило получить лучшее разрешение отдельных хроматографических пиков.

В модельных экспериментах на животных две фракции, собранные в процессе ВЭЖХ, проявляли анальгетическую активность. Первая содержала наиболее представленный полипептидный компонент APHC1 (время удерживания на колонке 34 мин), вторая содержала новый полипептидный компонент (время удерживания 43 мин). После дополнительной очистки на обращенно-фазовой колонке Luna C18 2 × 150 мм основной компонент этой фракции (APHC2) был выделен в индивидуальном состоянии. По данным MALDI-масс-спектрометрии, молекулярная масса компонента составила 6185 Да, что всего на 2 Да менее молекулярной массы анальгетического пептида APHC1. Столь незначительное различие в молекулярных массах двух активных компонентов может свидетельствовать об одной или нескольких заменах аминокислотных остатков в структуре полипептида или о возможном амидировании C-концевого аминокислотного остатка (с учетом ошибки измерения линейного режима масс-спектрометра ± 1 Да). Первоначально, версия с амидированием полипептида казалась более предпочтительной, так как для компонентов природных ядов такая модификация является распространенной [20].

Определение частичной N-концевой аминокислотной последовательности алкилированного 4-винилпиридином полипептида APHC2 выявило первые 23 а.о., полностью совпадающих с N-концевой последовательностью APHC1 (рис. 2).

Для идентификации фрагмента молекулы APHC2 с возможными заменами проводили пептидное картирование алкилированного белка. Анализ молекулярных масс триптических пептидов выявил только один пептид из центральной части молекулы, отличающийся на 2 Да от соответствующих

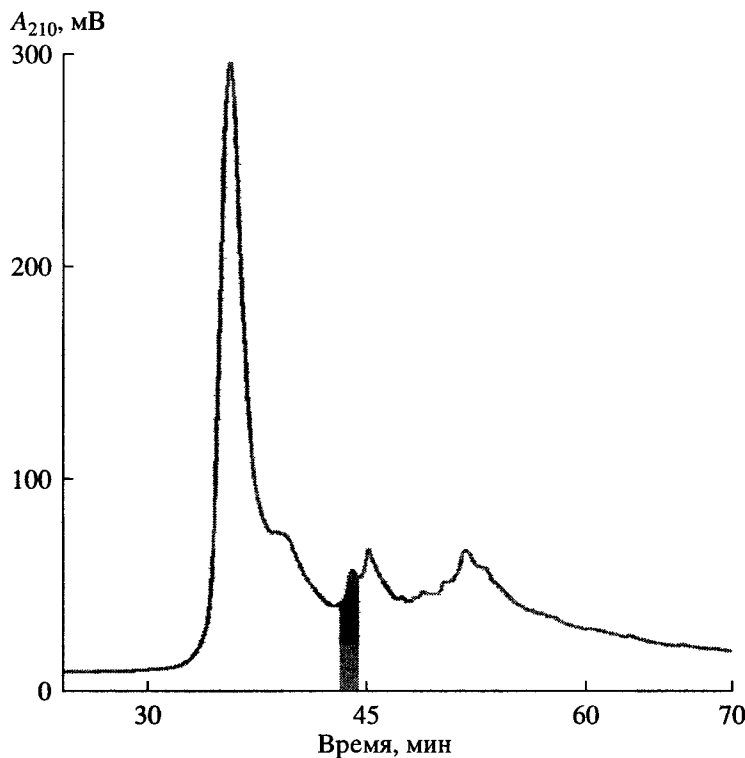


Рис. 1. Хроматографическое разделение фракции ингибиторов TRPV1-рецептора на колонке Jupiter C5 (Phenomenex) 4.6 × 150 мм. Элюцию фракций со скоростью 1.5 мл/мин проводили в линейном градиенте: 0–100% раствора Б в А за 105 мин, где раствор А – 10 мМ аммонийацетат (рН 7.2), раствор Б – 70% CH₃CN в растворе А. Фракция, содержащая полипептид APHC2, заштрихована.

	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	56
APHC1	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑
APHC2	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑
APHC3	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑
Ингибитор IV	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑
SHPI-1	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑
SHPI-2	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑	᠑

Рис. 2. Сравнение аминокислотных последовательностей анальгетических пептидов, выделенных из морской анемоны *H. crista* с ингибиторами протеиназ: ингибитор IV (P16344) из анемоны *H. crista*, SHPI-1 (P31713) и SHPI-2 (P81129) из анемоны *Stichodactyla helianthus*. Жирным шрифтом обозначены аминокислотные остатки, отличающиеся от аналогичных в последовательности APHC1 (B2G331).

фрагментов APHC1. Этот пептид был выделен из гидролизата обращенно-фазовой хроматографией на колонке Luna C18 1 x 150 мм. При установлении его аминокислотной последовательности была обнаружена единственная замена аминокислотного остатка в этом пептиде в 3-м положении P → V, которая обеспечивала разницу молекулярных масс полипептидов в 2 Да. В итоге была реконструирована полная аминокислотная последовательность но-

вого анальгетического полипептида актинии APHC2 (рис. 2).

Сравнение аминокислотной последовательности APHC2 по алгоритму BLAST, помимо явного фаворита APHC1 (98% гомологии, swiss prot B2G331), выявило наиболее значительное сходство с тремя известными ингибиторами протеиназ, ранее выделенными из анемоны: ингибитор IV (87% гомологии, swiss prot P16344) [12], SHPI-1 (83% гомологии, swiss

prot P31713) и SHPI-2 (81% гомологии, swiss prot P81129) [21].

Столь высокая гомология первичной структуры анальгетических пептидов и ингибиторов протеиназ подразумевает некое сходство ряда физико-химических свойств, в том числе и время удерживания на хроматографических носителях. В связи с этим была проверена анальгетическая активность смесевой хроматографической фракции после SP-Sephadex G-25, из которой в дальнейшем получали ингибитор протеаз InhVJ [13]. В результате было установлено, что данная фракция обладала обезболивающим действием в экспериментах на мышах. Анализ компонентного состава методом масс-спектрометрии выявил присутствие одного основного компонента и 5 менее представленных полипептидов.

Подбор условий разделения фракции привел к следующей схеме выделения активных молекул. Первоначально фракцию ингибиторов протеиназ (ранее полученную [13]) в 10 мМ аммоний-ацетатном буфере наносили на катионообменную колонку TSK-gel CM-35W, на которой основной белковый компонент – ингибитор протеиназ InhVJ не сорбировался. Далее ступенчатым градиентом в 30 и 300 мМ NaCl были получены две фракции, одна из которых (30 мМ NaCl) обладала искомой активностью. Дальнейшее разделение проводили последовательно на обращенно-фазовых сорбентах Delta-Pak C18-300 (рис. 3а); RP-amide (рис. 3б); Luna C18 (рис. 3в). В результате был выделен в индивидуальном виде единственный активный компонент, названный APHC3, с молекулярной массой 6111 Да. Сложность схемы выделения обусловлена наличием в исходной фракции ингибиторов протеиназ большого количества полипептидов с единичными заменами, что было ранее отмечено при клонировании кДНК APHC1 [19].

Определение частичной N-концевой аминокислотной последовательности 32 а.о. APHC3 подтвердило высокий уровень гомологии с APHC1, и наличие всего трех замен аминокислотных остатков в положениях 18, 23 и 31 (рис. 2).

Нам не удалось идентифицировать все пептидные фрагменты после расщепления трипсином полипептидной цепи восстановленного и алкилированного по цистеинам полипептида APHC3. Поэтому APHC3 был подвергнут фрагментированию протеиназой Glu-C и структура недостающих пептидных фрагментов была определена после их выделения из пептидной смеси обращенно-фазовой хроматографией на колонке Luna C18 1 × 150 мм:

26–38 TGKSTPFIYGGCE, 39–45 GNGNNFE,
46–56 TLRACRGICRA.

Молекулярная масса полной реконструированной из пептидов аминокислотной последовательности APHC3 соответствовала измеренной ранее масс-спектрометрически. Последовательность полипептида APHC3 отражена на рис. 2 совместно с

наиболее гомологичными белками, определенными по анализу гомологии структуры методом BLAST*. Наиболее гомологичными белками (идентичность 80–92%), как и в случае с APHC2, стали APHC1, ингибитор IV, SHPI-1 и SHPI-2.

Из-за ограничений, накладываемых при любом исследовании природных белков, содержание которых в природных источниках незначительно, первоначально были получены только предварительные данные по обезболивающей активности выделенных полипептидов на мышах. Для проведения детальных испытаний была разработана схема получения рекомбинантных аналогов полипептидов и проведена наработка этих продуктов.

С этой целью были получены синтетические нуклеотидные последовательности (рис. 4), кодирующие соответствующие полипептиды с учетом частоты использования кодонов штамма-продуцента и содержащие сайты рестрикции EcoRI и XhoI, по которым они и были клонированы в вектор pET32b+. В качестве белка-партнера был выбран тиоредоксин, обеспечивающий более высокий выход и правильность замыкания дисульфидных связей у цистеинбогатых белков. Аминокислотные последовательности анальгетических пептидов не содержат остатка Met, что позволяет использовать для расщепления гибридного белка метод гидролиза пептидной связи бромцианом. Поэтому нуклеотидная последовательность, кодирующая Met, была вставлена между фрагментами, кодирующими полипептиды и тиоредоксин. Полученными конструкциями трансформировали штамм *E. coli* BL21(DE3), экспрессию генов белков индуцировали добавлением IPTG на стадии экспоненциального роста клеток.

Рекомбинантные полипептиды были выделены в соответствии с протоколом, описанным в “Эксперимент. части”. Выход составил ~8 мг/л культуры. Правильность синтезированной последовательности была подтверждена масс-спектрометрией рекомбинантных продуктов. Сравнение хроматографической подвижности природных белков и их рекомбинантных аналогов не выявило различий, что позволило предположить правильность укладки полипептидной цепи рекомбинантных полипептидов в пространстве. Биологическая активность в модельных экспериментах на животных рекомбинантных APHC2 и APHC3 полностью соответствовала активности нативных полипептидов.

Для определения анальгетического эффекта APHC2 и APHC3 в моделях тепловой стимуляции боли использовали тест “горячая пластина”. Этот тест оценки болевой чувствительности основан на активации TRPV1 и, возможно, некоторых других рецепторов. Известно, что именно в этих тестах мыши, дефектные по гену TRPV1, суще-

* Basic Local Alignment Search Tool.

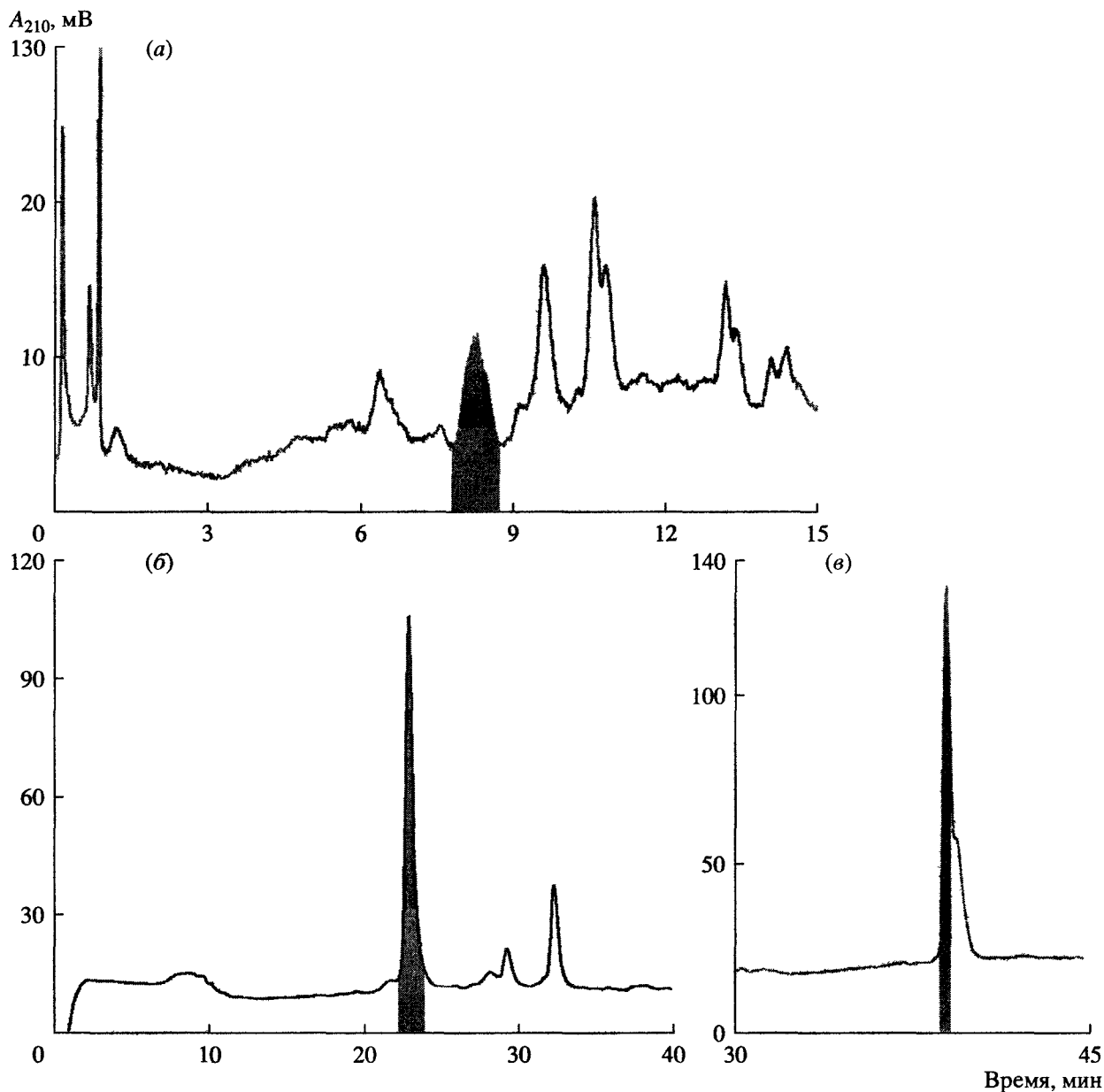


Рис. 3. Результаты постадийного разделения фракции ингибиторов трипсина из морской анемоны *H. crispa* методами обращенно-фазовой хроматографии: (а) – хроматография на колонке Delta-Pak C18-300 (Waters) 4.6 × 250 мм, со скоростью 2 мл/мин в 10 мМ аммоний-ацетатном буфере (рН 7.2), линейный градиент концентрации CH_3CN 0–50% за 15 мин; (б) – хроматография на колонке RP-amide (Supelco) 2 × 100 мм, со скоростью 0.3 мл/мин в 10 мМ аммоний-ацетатном буфере (рН 7.2), линейный градиент концентрации CH_3CN 17.5–54% за 70 мин; (в) – хроматография на колонке Luna C18 (Phenomenex) 2 × 150 мм, со скоростью 0.15 мл/мин в 0.1% ТФА, линейный градиент концентрации CH_3CN 0–70% за 70 мин. Фракции с обезболивающим эффектом заштрихованы на каждой из стадий.

ственно различались по времени реакции от мышцей дикого типа [16].

Внутривенное введение полипептидов АРНС2 или АРНС3 (до 1 мг/кг) не оказывало никакого токсического воздействия на мышцей и не нарушало их нормального поведения. Несмотря на близкую структурную гомологию, полипептиды АРНС2, АРНС3 различались по анальгетической активно-

сти в тесте “горячая пластина” как между собой, так и при сравнении с АРНС1 или с ингибитором трипсина быка – ВРТИ, одним из наиболее эффективных ингибиторов типа Кунитца (рис. 5). Для анализа использовали дозу полипептидов 0.1 мг/кг веса, которая соответствовала расчетной дозе, ранее использовавшейся в анализе грубых фракций и очищенных природных полипептидов.

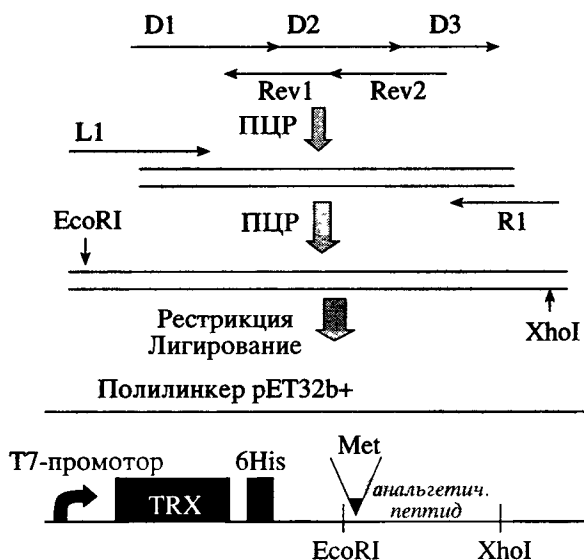


Рис. 4. Схема сборки конструкций для получения рекомбинантных аналогов на основе плазмидного вектора рЕТ32b+: D1–D3, L1, R1, Rev1, Rev2 – праймеры, TRX – тиоредоксин.

Наибольшим анальгетическим потенциалом обладал АРНС3, его активность в этом тесте значительно превосходила активность АРНС1. АРНС2 был слабо активен, однако действие его как анальгетика было, тем не менее, статистически достоверно. Ингибитор сериновых протеиназ ВРТИ, использованный как контроль опосредованных путей влияния на болевые рецепторы, не проявлял анальгетической активности.

При изучении специфичности ингибитора протеиназ InhVJ ранее было показано, что он преимущественно ингибирует трипсин и α -химотрипсин [13]. Поэтому ингибиторное действие анальгетических пептидов проверяли именно на этих ферментах (табл. 1). АРНС2 и АРНС3 показали слабую ингибиторную активность – на три порядка ниже, чем их ближайший структурный гомолог SHPI-1. При

Таблица 1. Константы ингибирования трипсина и α -химотрипсина, рассчитанные по методу Диксона

Полипептид	K_i , М	
	трипсин	химотрипсин
АРНС2	9×10^{-7}	4.5×10^{-6}
АРНС3	5×10^{-7}	7×10^{-6}
ВРТИ	6×10^{-14} [22]	1.8×10^{-13} [23]
SHPI-1	1×10^{-10} [21]	2.3×10^{-9} [21]

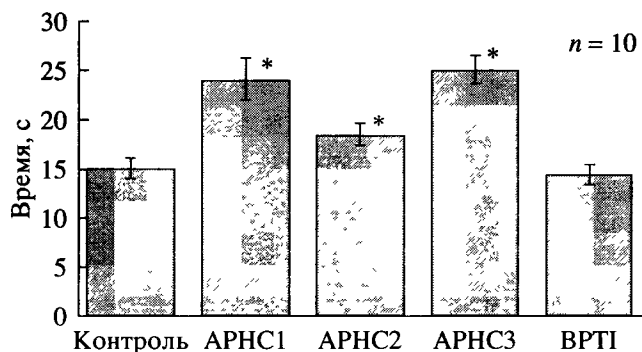


Рис. 5. Влияние внутривенного введения полипептидов АРНС1, АРНС2, АРНС3 и ВРТИ (0.1 мг/кг веса) на время задержки облизывания задних лап в тесте "горячая пластина" (55°C). Статистически достоверные различия ($P < 0.05$) отмечены звездочкой.

этом оба полипептида чуть лучше ингибировали трипсин, чем химотрипсин. Учитывая то, что ВРТИ не активен в тесте "горячая пластина", можно уверенно говорить о том, что функция ингибиторов сериновых протеиназ у АРНС2 и АРНС3 является остаточной, а основная их биологическая мишень – нейрональные рецепторы.

Пока еще не проведены электрофизиологические исследования новых полипептидных анальгетиков АРНС2 и АРНС3, однако очевидно, что они, скорее всего, являются модуляторами TRPV1-рецепторов. Единичные замены аминокислотных остатков в полипептидной цепи структур типа Кунитца у анемон могут приводить как к изменению активности (падение анальгетической способности АРНС3 > АРНС1 > АРНС2), так и полной смене фармакологических свойств молекулы (ингибитор протеиназ SHPI-1 и анальгетические полипептиды АРНС1–АРНС3). По предварительным данным, число генов полипептидных компонентов измеряется, возможно, многими десятками [19], поэтому потенциал изучения полипептидных компонентов активней огромен. Мы надеемся, что последующие наши исследования экстрактов из анемон приведут к открытию модуляторов новых типов и подтипов ионных каналов и других рецепторов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы и материалы следующих производителей: Sigma (США), ICN (США), Fluka (Германия), Merck (Германия), Химмед (Россия), Криохром (Россия). Все растворы готовили с использованием деионизованной воды (сопротивление 18.2 МОм), полученной на установке Millipore (США). Протеолитические ферменты – трипсин (КФ 3.4.21.4), α -химотрипсин (КФ 3.4.21.1) эндопротеиназа Glu-C (КФ 3.4.21.19) были приобретены у компании "Sigma" (США).

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”.

В работе использовали конечные фракции после разделения спиртовых и водных экстрактов морской анемоны *H. crispera* на ионообменном сорбенте SP-Sephadex G-25 2.5 × 50 см (Pharmacia, Швеция), любезно предоставленные ТИБОХ РАН. Методика приготовления экстрактов анемонов и их фракционирование были подробно изложены ранее в работах [13, 19].

ВЭЖХ полипептидов осуществляли на хроматографе KONTRON (Италия). Для выделения полипептида APHC2 исходную фракцию наносили на колонку Jupiter C5 (Phenomenex, США) 4.6 × 150 мм, уравновешенную в стартовом буфере (10 mM аммоний-ацетат (pH 7.2)). Элюирование фракций проводили со скоростью 1.5 мл/мин в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0 → 70% CH₃CN за 105 мин). Для выделения полипептида APHC3, исходную фракцию первоначально разделяли на ионообменной колонке TSK-gel CM-35W (LKB, Швеция) в ступенчатом градиенте 3 и 30% буфера, содержащего 1 M NaCl, в 10 mM аммоний-ацетатном буфере (pH 7.2) при скорости потока 2 мл/мин. Фракцию, элюировавшуюся на первой ступени градиента, разделяли далее при тех же значениях pH (10 mM аммоний-ацетат как буфер А, 70% CH₃CN в буфере А – как буфер Б) на обращенно-фазовой колонке Delta-Pak C18-300 (Waters, США) 4.6 × 250 мм, со скоростью 2 мл/мин в линейном градиенте буфера Б 0 → 50% за 15 мин. Единственная активная фракция подвергалась следующему этапу разделения на обращенно-фазовой колонке RP-amide (Supelco, США) 2 × 100 мм, со скоростью 0.3 мл/мин в линейном градиенте концентрации CH₃CN 17.5 → 54% за 70 мин в тех же буферных системах. Окончательную очистку APHC3 проводили на обращенно-фазовой колонке Luna C18 (Phenomenex, США) 2 × 150 мм со скоростью 0.15 мл/мин, применяя линейный градиент концентрации CH₃CN 0 → 70% за 70 мин в 0.1% TFA. Незначительные примеси чужеродных белков, которые не мешали определению биологической активности, удаляли впоследствии хроматографически после реакции алкилирования.

Концентрацию белка в пробах определяли по спектру поглощения в 1-см кювете на спектрофотометре Hitachi U3210 (Япония).

Масс-спектрометрический анализ проводили на времяпролетном масс-спектрометре MALDI Ultraflex TOF-TOF (Bruker Daltonics, Германия) или MALDI-LR (Micromass, Великобритания), используя в качестве матричных растворов: 2,5-дигидроксibenзойную кислоту (10 мг/мл в 70% CH₃CN,

содержащем 0.1% TFA) или α-циано-4-гидроксикоричную кислоту (10 мг/мл в 50% CH₃CN, содержащем 0.1% TFA). Спектры записывали в режиме детекции положительных ионов в прямом или рефлекторном режимах.

Алкилирование полипептидов 4-винилпиридином по остаткам цистеинов проводили по адаптированной методике [24]. Полипептиды растворяли в 10 мкл 100 mM фосфатного буфера (pH 7.5), содержащего 6 M гуанидингидрохлорид и 3 mM EDTA, и инкубировали ночь при 45°C. Затем раствор охлаждали и дегазировали в ультразвуковой бане, после чего добавляли 5 мкл восстанавливающего раствора (300 mM фосфатный буфер (pH 12.3), 200 mM дитиотреитол, 3 mM EDTA) и выдерживали 1 ч при 37°C. Тиольные группы цистеинов алкилировали добавлением 3 мкл 10% 4-винилпиридина в метаноле в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте. *Модифицированный полипептид* разводили в 100–300 мкл 0.1% TFA и обессоливали на обращенно-фазовой колонке Luna C18 (Phenomenex, США) 2 × 150 мм, применяя линейный или ступенчатый градиент концентрации ацетонитрила.

N-Концевую аминокислотную последовательность определяли на автоматическом секвенаторе белков Procise модели 492 (Applied Biosystems, США) по методу Эдмана с использованием программы производителя.

Пептидное картирование проводили на количестве вещества <1 нмоль. Предварительно высушенные алкилированные образцы растворяли в 10 мкл 100 mM аммоний-бикарбонатного буфера (pH 8.5), содержащего 2 mM CaCl₂, далее прибавляли 2–3 мкл раствора фермента (трипсин или эндопротеиназа Glu-C) в том же буферном растворе с учетом конечного соотношения фермент–субстрат = 1 : 20. Смесь выдерживали при 37°C несколько часов, контроль полноты реакции осуществляли масс-спектрометрически. Продукты реакции разделяли ВЭЖХ на обращенно-фазовой микроколонке Luna C18 (Phenomenex, США) 1 × 150 мм в градиенте концентрации CH₃CN (0 → 60% за 60 мин) в 0.1% TFA.

Компьютерный анализ измеренных и расчетных масс пептидов и белков проводили с помощью программы GPMW 4.0 (Дания).

Сборку экспрессирующих конструкций осуществляли из синтетических олигонуклеотидных праймеров (ЗАО “Евроген”). Фрагмент гена, кодирующий зрелые полипептиды, получали с помощью ПЦР из праймеров, подобранных с учетом оптимизации использования кодонов для *E. coli* (табл. 2). В стандартную реакцию смесь добавляли по 10 пмоль соответствующих внутренних праймеров (D1, D2, D3, Rev1, Rev2). Реакцию амплификации проводили в следующих условиях: денатурация ДНК – 94°C, 30 с; отжиг праймеров – 55°C, 30 с; синтез ДНК – 72°C, 30 с (20 циклов). Смесь разводили в

Таблица 2. Структура олигонуклеотидов, использованных для сборки генов, кодирующих последовательности зрелых полипептидов. В скобках указано для какого полипептида они были использованы: (2) – АРНС2, (3) – АРНС3

Олигонуклеотид	Структура олигонуклеотида (5'–3')
D1 (2)	CCTGGAACCGAAAGTTGTTGGTCCGTGCACCGCTTACTTCCGTCGTTTCT
D2 (2)	ACTTCGACTCTGAAACCGGTAATGCACCCCTTTCATCTACGGTGGTTGC
D3 (2)	GAAGGTAACGGTAACAACCTTCGAAACCCCTGCGTGCTTGCCGTGCTATC
D1 (3)	CCTGGAACCGAAAGTTGTTGGTCCGTGCACCGCTTACTTCCC GCGTTTCT
D2 (3)	ACTTCAACTCTGAAACCGGTAATGCACCCCTTTCATCTACGGTGGTTGC
D3 (3)	GAAGGTAACGGTAACAACCTTCGAAACCCCTGCGTGCTTGCCGTGGTATC
Rev1 (2)	CGGTTTCAGAGTCGAAGTAGAAACGACGGAAGTAAG
Rev1 (3)	CGGTTTCAGAGTTGAAGTAGAAACGCGGGAAGTAAG
Rev2 (2, 3)	GTTGTTACCGTTACCTTCGCAACCACCGTAGATGAAA
L1 (2, 3)	GGAATTCATGGGTTCTATCTGCCTGGAACCGAAAGTTGTTG
R1 (2)	CTCTCGAGTCAAGCACGGCAGATAGCACGGCAAGCACGCAG
R1 (3)	CTCTCGAGTCAAGCACGGCAGATACCACGGCAAGCACGCAG

1000 раз водой и ставили амплификацию в тех же условиях, используя внешние праймеры (R1, L1). Продукт амплификации (около 180 п.о.) последовательно экстрагировали смесью фенол–хлороформ (1 : 1) и хлороформом, после чего высаживали этанолом в присутствии 0.3 М ацетата натрия (pH 5.2), обрабатывали рестриктазами EcoR1/XhoI, очищали с помощью гель-электрофореза и лигировали с расщепленной теми же рестриктазами плазмидой pET32b (Novagen, США). Лигаты трансформировали в клетки штамма XL1-Blue. Полученные клоны анализировали с помощью ПЦР “на колониях”, используя пару универсальных праймеров L1, R1, и секвенировали.

Выделение рекомбинантных аналогов. Полученными экспрессирующими конструкциями трансформировали клетки штамма BL21(DE3). Клетки выращивали в 200 мл среды LB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл), при 37°C с интенсивной аэрацией до достижения значения оптического поглощения A_{600} величины 0.6–0.8 (7–9 ч), после чего добавляли IPTG до конечной концентрации 0.2–0.4 mM и инкубировали еще 12–16 ч при 37°C. Бактериальные клетки осаждали из раствора центрифугированием при 4°C, 5000 об/мин в течение 15 мин. Осадок клеток ресуспендировали в 20 мл стартового буфера (20 mM Трис-НСl (pH 7.5), 300 mM NaCl), помещали в лед и подвергали ультразвуковой дезинтеграции 4 раза по 3 мин. Клеточный лизат центрифугировали при 15000 об/мин в течение 20 мин

(4°C) и полученный супернатант наносили на аффинную колонку с Co²⁺-сефарозой (Clonotech, США), уравновешенную стартовым буфером. Колонку промывали 5 полными объемами того же буфера, после чего специфически сорбированную фракцию элюировали буфером (20 mM Трис-НСl (pH 7.5), 300 mM NaCl, 150 mM имидазол). Далее к полученной фракции добавляли раствор 10 M соляной кислоты до конечной концентрации 0.2 M и 600-кратный молярный избыток BrCN по отношению к измеренному количеству белка. Реакцию проводили 14–16 ч при комнатной температуре в темноте. Полученную смесь упаривали досуха, растворяли в 0.1% TFA и наносили на обращенно-фазовую колонку Jupiter C4 (Phenomenex, США) 4.6 × 150 мм. Разделение продуктов реакции проводили со скоростью 1 мл/мин в линейном градиенте концентрации CH₃CN (10 → 70% за 40 мин) в 0.1% TFA. Детекцию проводили спектрофотометрически при длинах волн 214 и 280 нм. Чистоту рекомбинантных продуктов оценивали масс-спектрометрией.

Исследование анальгетической активности полипептидов проводили на мышях линии CD-1 (НПП “Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН”) весом 19–21 г. Животные содержались при температуре 23 ± 2°C. Каждое животное использовалось для эксперимента один раз. Пептиды, растворенные в физиологическом растворе до конечной концентрации 0.1 мг/кг, вводили внутривенно в хвостовую вену. Контрольным животным в хвостовую

вую вену вводили чистый физиологический раствор. Через 15 мин мышь помещали на разогретую до 55°C металлическую пластину, после чего регистрировали время с момента посадки до первого облизывания задней лапы. Для статистической обработки данных использовали пакет программ ORIGIN (OriginLab., США). Достоверность различий между контрольной и экспериментальной группами определяли при помощи анализа вариабельности (ANOVA) и пост-теста Тьюки.

Ингибирование протеолитической активности определяли спектрофотометрически в 96-луночных планшетах. К аликвоте 0.5 мкМ трипсина или α -химотрипсина в 50 мМ Трис-НСl (рН 8.0) добавляли исследуемый полипептид в различных концентрациях, после чего объем реакционной смеси доводили буферным раствором до 90 мкл и инкубировали в течение 10 мин при 37°C. После инкубации определяли оставшуюся ферментативную активность добавлением 10 мкл раствора субстрата. Для определения активности трипсина в качестве субстрата использовали 3 мМ *n*-нитроанилид *N*-бензоил-*D,L*-аргинина (BAPNA) в 10% диметилформамиде, 100 мМ Трис-НСl (рН 8.0), а для α -химотрипсина – 3 мМ этиловый эфир *N*-бензоил-*L*-тирозина (BTEE) в 10% диметилформамиде, 100 мМ Трис-НСl (рН 8.0). Константы ингибирования определяли по методу Диксона [25] через 10 мин инкубации при 37°C, измеряя спектрофотометрически количество образовавшихся *n*-нитроанилина при 410 нм (трипсин) или тирозина при 250 нм (α -химотрипсин).

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность Егорову Ц.А. и Мусолямову А.Х. за помощь в определении аминокислотной последовательности полипептидов, Соко-тун И.Н. и Козловской Э.П. за предоставление фракций ингибиторов трипсина. Работа была поддержана РФФИ, программой фундаментальных исследований Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”, грантами федерального агентства по науке и инновациям.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Carli A., Bussotti S., Mariottini G.L., Robbiano L. // *Toxicon*. 1996. V. 34. P. 496–500.
2. Honma T., Shiomi K. // *Mar. Biotechnol.* (N.Y.). 2006. V. 8. P. 1–10.
3. Norton R.S. // *Toxicon*. 1991. V. 29. P. 1051–1084.
4. Bosmans F., Tytgat J. // *Toxicon*. 2007. V. 49. P. 550–560.
5. Castaneda O., Harvey A.L. // *Toxicon*. 2009. В печати.
6. Aneiros A., Garcia I., Martinez J.R., Harvey A.L., Anderson A.J., Marshall D.L., Engstrom A., Hellman U., Karlsson E. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1993. V. 1157. P. 86–92.
7. Castaneda O., Sotolongo V., Amor A.M., Stocklin R., Anderson A.J., Harvey A.L., Engstrom A., Wernstedt C., Karlsson E. // *Toxicon*. 1995. V. 33. P. 603–613.
8. Schweitz H., Bruhn T., Guillemare E., Moinier D., Lancelin J.M., Beress L., Lazdunski M. // *J. Biol. Chem*. 1995. V. 270. P. 25121–25126.
9. Diochot S., Schweitz H., Beress L., Lazdunski M. // *J. Biol. Chem*. 1998. V. 273. P. 6744–6749.
10. Honma T., Kawahata S., Ishida M., Nagai H., Nagashima Y., Shiomi K. // *Peptides*. 2008. V. 29. P. 536–544.
11. Antuch W., Berndt K.D., Chavez M.A., Delfin J., Wuthrich K. // *Eur. J. Biochem*. 1993. V. 212. P. 675–684.
12. Зыкова Т.А., Винокуров Л.М., Маркова Л.Ф., Козловская Э.П., Еляков Г.Б. // *Биоорган. химия*. 1985. V. 11. P. 293–301.
13. Sokotun I.N., Leichenko E.V., Vakorina T.I., Es'kov A.A., P'ina A.P., Monastyrnaya M.M., Kozlovskaya E.P. // *Russ. J. Bioorgan. Chemistry*. 2007. V. 33. P. 415–422 (Соко-тун И.Н., Лейченко Е.В., Вакорина Т.И., Еськов А.А., Ильина А.П., Монастыр-ная М.М., Козловская Э.П. // *Биоорган. химия*. 2007. V. 33. P. 448–455).
14. Deval E., Noel J., Lay N., Alloui A., Diochot S., Friend V., Jodar M., Lazdunski M., Lingueglia E. // *EMBO J*. 2008. V. 27. P. 3047–3055.
15. Андреев Я.А., Козлов С.А., Козловская Э.П., Грушин Е.В. // *Докл. АН*. 2009. V. 424. P. 688–691.
16. Caterina M.J., Leffler A., Malmberg A.B., Martin W.J., Trafton J., Petersen-Zeitze K.R., Koltzenburg M., Basbaum A.I., Julius D. // *Science*. 2000. V. 288. P. 306–313.
17. Immke D.C., Gavva N.R. // *Semin. Cell Dev. Biol*. 2006. V. 17. P. 582–591.
18. Szallasi A., Cortright D.N., Blum C.A., Eid S.R. // *Nat. Rev. Drug. Discov*. 2007. V. 6. P. 357–372.
19. Andreev Y.A., Kozlov S.A., Koshelev S.G., Ivanova E.A., Monastyrnaya M.M., Kozlovskaya E.P., Grishin E.V. // *J. Biol. Chem*. 2008. V. 283. P. 23914–23921.
20. Kozlov S.A., Grishin E.V. // *Toxicon*. 2007. V. 49. P. 721–726.
21. Delfin J., Martinez I., Antuch W., Morera V., Gonzalez Y., Rodriguez R., Marquez M., Saroyan A., Larionova N., Diaz J., Padron G., Chavez M. // *Toxicon*. 1996. V. 34. P. 1367–1376.
22. Gebhard W., Tschesche H., Fritz H. // *Proteinase Inhibitors/Eds Barrett A.J., Salvesen G.* Amsterdam: Elsevier, 1986. P. 375–388.
23. Delaria K.A., Muller D.K., Marlors C.W., Brown J.E., Das R.C., Rocznick S.O., Tamburini P.P. // *J. Biol. Chem*. 1997. V. 272. P. 12209–12214.
24. Lundell N., Schreitmuller T. // *Anal. Biochem*. 1999. V. 266. P. 31–47.
25. Dixon M. // *Biochem. J*. 1953. V. 55. P. 170–171.

New Polypeptide Components from the *Heteractis crispa* Sea Anemone with Analgesic Activity

S. A. Kozlov^{a,#}, Ya. A. Andreev^a, A. N. Murashev^b, D. I. Skobtsov^b,
I. A. D'yachenko^b, and E. V. Grishin^a

[#]Phone (495) 336-6540; fax: (495) 330-7301; e-mail: serg@ibch.ru

^a Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow; 117997 Russia

^b Branch of the Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia

Two new polypeptide components which exhibited an analgesic effect in experiments on mice were isolated from the *Heteractis crispa* sea tropical anemone by the combination of chromatographic methods. The APHC2 and APHC3 new polypeptides consisted of 56 amino acid residues and contained six cysteine residues. Their complete amino acid sequence was determined by the methods of Edman sequencing, mass spectrometry, and peptide mapping. An analysis of the primary structure of the new peptides allowed for their attribution to a large group of trypsin inhibitors of the Kunitz type.

An interesting biological function of the new polypeptides was their analgesic effect on mammals, which is possibly realized via the modulation of the activity of the TRPV1 receptor and was not associated with the residual inhibiting activity towards trypsin and chymotrypsin. The analgesic activity of the APHC3 polypeptide was measured on the hot plate model of acute pain and was significantly higher than that of APHC2. Methods of preparation of the recombinant analogues were created for both polypeptides.

Key words: the *Heteractis crispa* sea anemone; polypeptide inhibitors of the Kunitz type, structure, analgesic activity; functional expression