



ПЕПТИДЫ КУНИТЦ-ТИПА АКТИНИИ *HETERACTIS CRISPA* – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ¹

© 2017 г. О. В. Синцова*, Е. А. Пислягин*, И. Н. Гладких*, М. М. Монастырская*, Е. С. Менчинская*, Е. В. Лейченко^{*, **, **}, Д. Л. Аминин*, Э. П. Козловская*

*ФГБУН Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, 690022, Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159, Россия

**ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет» 690091, ул. Суханова, 8, Владивосток, Россия

Поступила в редакцию 08.06.2016 г.

Принята к печати 16.06.2016 г.

Исследована антигистаминная активность рекомбинантных пептидов, ингибиторов сериновых протеаз Кунитц-типа актинии *Heteractis crispa*. Показано, что пептиды гHCGS1.19 и гHCGS1.36 в концентрации 10 мкМ ингибируют индуцированное гистамином повышение концентрации ионов кальция на 62.2 и 84.0% соответственно. Противовоспалительный эффект этих соединений может являться результатом как опосредованных реакций взаимодействия пептидов с протеазами, вовлеченными в эти процессы, так и следствием блокирования гистаминовых рецепторов H₁-типа.

Ключевые слова: актинии, ингибиторы протеаз Кунитц-типа, антигистаминная активность.

DOI: 10.7868/S0132342316060130

ВВЕДЕНИЕ

Как известно, для лечения и предупреждения процессов воспаления, которые лежат в основе патогенеза ряда заболеваний, используют соединения, способные подавлять активность протеаз и медиаторов воспаления, индуцирующих развитие воспалительных процессов [1], или ингибировать вовлеченные в них ионные каналы [2] и ионотропные рецепторы [3]. Ингибиторы протеаз, обнаруженные как у беспозвоночных, так и у млекопитающих, применяют при лечении патологий, вызванных, главным образом, нарушением активности ферментов [1, 4]. Примерами успешного использования полипептидов Кунитц-типа в терапии являются БПТИ – бычий панкреатический ингибитор трипсина, снижающий количество геморрагических осложнений, возникающих при переливании крови и воспалительных состояний, связанных с циркуляцией крови вне организма, а также двудоменный ингибитор сериновых протеаз бикунин, который используется при лечении септических шоков, панкреатитов и эндovasкулярной коагуляции [5, 6]. Такие эффекты

достигаются за счет способности пептидов ингибировать трипсин, α-химотрипсин, эластазу лейкоцитов, плазмин, катепсин G, а также протеазы каскада коагуляции. Исследования *in vitro* показали, что бикунин ингибирует продукцию таких мощных провоспалительных молекул, как тромбоксан B₂, фактор некроза опухоли-альфа (ФНО-α) и интерлейкин 8, индуцированную введением бактериального липополисахарида (ЛПС) [6].

Огромный интерес для исследования представляют пептидные ингибиторы сериновых протеаз морских ядовитых кишечнополостных, актиний, благодаря их структурному разнообразию и полифункциональности [3, 5, 7–9]. Установлено, что пептиды Кунитц-типа актиний ингибируют как сериновые [10–12], так и аспарагиновые и цистеиновые протеазы, включая “протеазы воспаления”, эластазу, катепсин G, протеиназу 3 и др. [2, 13], что обуславливает их противовоспалительное действие *in vivo*. Так, для нативных пептидов *H. crispa* HCRG1 и HCRG2 показано наличие ингибирующего и протективного действия по отношению к некоторым медиаторам воспаления [14]. Было обнаружено, что эти эффекты связаны с ингибированием продукции ФНО-α, интерлейкина-6 и проинтерлейкина-1β, индуцируемой ЛПС *Escherichia coli* в макрофагах мыши. Антигистаминная активность обнаружена у пептидов *H. crispa* RmInI и RmInII: они ослабляют клинические проявления развития аллергической реакции. Наблюдаемый эффект является дозозависимым [15].

¹ Статья публикуется по материалам сообщения, представленного на конференции “Химическая биология-2016”, г. Новосибирск, 24–29 июля 2016 г.

Сокращения: ВПТИ – бычий панкреатический ингибитор трипсина, ФНО-α фактор некроза опухоли – альфа, ЛПС – липополисахарид.

Автор для связи (тел.: +7 (908) 440-62-68; эл. почта: 969844@gmail.com).

В настоящей работе была изучена антигистаминная активность рекомбинантных HCGS-пептидов *H. crispera* на модели макрофагов костного мозга мыши. Показано, что пептиды гHCGS1.19 и гHCGS1.36 можно рассматривать в качестве потенциальных противовоспалительных агентов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было показано, что ингибиторы сериновых протеаз Кунитц-типа актинии *H. crispera* кодируются мультигенным семейством и образуют комбинаторную библиотеку, включающую GS-, RG-, GG- и GN-пептиды [16]. GS-пептиды составляют наиболее многочисленную группу и, в зависимости от типа аминокислот, входящих в реактивный сайт, группируются в три кластера (рис. 1). Кластер 1 состоит из пептидов, содержащих остаток треонина в положении P1 реактивного сайта (рис. 2). Следует заметить, что пептиды APHC1–APHC3, входящие в состав этого кластера, кроме ингибирования активности трипсина и химо трипсина, блокируют болевой TRPV1 рецептор [3, 8, 17, 20]. Кластер 2 включает GS-пептиды, которые содержат остаток аргинина в положении P1 (рис. 2). Кроме того, в состав этого кластера входят пептиды из актинии *S. helianthus*, SHPI-1 и SHPI-2, содержащие лизин в этом положении. Ингибитор SHPI-1 обладает сродством к различным протеазам [2, 13], и блокирует Kv1-каналы [2]. Кластер 3 содержит GS- и RG-пептиды, у которых в положении P1 реактивного сайта находится лизин, подобно ингибиторам из актинии *S. helianthus* и BPTI, бычьему панкреатическому ингибитору трипсина [18].

Ранее было показано, что пептиды гHCGS1.10, гHCGS1.19 и гHCGS1.36 наряду с трипсинингибирующей активностью обладают также анальгетической [21]. В настоящей работе было продолжено исследование их противовоспалительного потенциала. Рекомбинантные пептиды были получены в бактериальной системе: выход составил в среднем 5 мг/л. Согласно филогенетическому анализу, пептиды HCGS1.10 и HCGS1.36 входят в состав так называемого анальгетического кластера 1, а HCGS1.19 является представителем кластера 2 (рис. 1). Молекулярные массы пептидов по данным MALDI-TOF-масс-спектрометрии отличались от расчетных масс не более чем на 0.02% (таблица). Аминокислотные последовательности пептидов (20 а.о.), установленные с помощью автоматического секвенирования по методу Эдмана, оказались идентичными последовательностям, выведенным на основе последовательностей кодирующих их генов (рис. 2).

Константы ингибирования (K_i) трипсина для рекомбинантных пептидов были определены по методу Диксона [22]. Для гHCGS1.10 и гHCGS1.36

они оказались равны 2.1×10^{-7} и 1.0×10^{-7} М соответственно, что хорошо согласуется со значениями K_i трипсина для природных пептидов-анальгетиков – представителей этой группы, APHC1 – APHC3 (таблица). K_i трипсина HCGS1.19 составила 3.0×10^{-8} М (таблица), что на два порядка больше, чем K_i трипсина для пептида SHPI-1, обладающего достаточно большим сходством характера распределения молекулярного электростатического потенциала, определяющего во многом специфичность и кинетику связывания ингибитора с активным центром протеазы или канала [12, 20]. Уменьшение сродства к протеазам для представителей анальгетического кластера HCGS1.10 и HCGS1.36 вызвано как изменением заряда аминокислотного остатка в положении P1 реактивного сайта (вследствие замен Arg/Lys14Thr), так и рядом точечных замен в основном и дополнительном сайтах связывания (рис. 1, таблица), что и обуславливает их полифункциональность, как было показано для APHC1 и APHC3 [3, 16].

Недавно нами было установлено, что гHCGS1.20, содержащий остаток лизина в положении P1 и входящий в состав кластера 3 (рис. 1), помимо ингибирования трипсина и химо трипсина способен оказывать противовоспалительное действие *in vitro*, а именно, ингибировать синтез оксида азота макрофагами RAW 264.7, индуцированный добавлением ЛПС. Кроме того, этот пептид блокировал влияние гистамина на увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в макрофагах костного мозга мыши, что может указывать на ингибирование H_1 -гистаминового рецептора [19]. В настоящей работе мы продолжили изучение антигистаминной активности рекомбинантных пептидов Кунитц-типа актинии *H. crispera*, HCGS1.10, HCGS1.19 и HCGS1.36.

Исследование взаимодействия рекомбинантных пептидов с гистаминовыми рецепторами проводили на макрофагах костного мозга мыши. Антигистаминную активность пептидов оценивали по их влиянию на внутриклеточную концентрацию ионов кальция $[Ca^{2+}]_i$, значительно увеличивающуюся вследствие взаимодействия гистамина с рецепторами H_1 -типа мембран макрофагов [23, 24]. С этой целью макрофаги нагружали кальций-чувствительным флуоресцентным зондом Fluo-3/AM и регистрировали изменение интенсивности флуоресценции зонда до и после введения гистамина в инкубационную среду в присутствии исследуемых пептидов. В этих экспериментах в качестве стандартного блокатора гистаминовых рецепторов H_1 -типа использовали фексофенадин, подавляющий Ca^{2+} -ответ клеток на гистамин.

Инкубация клеток с исследуемыми пептидами в концентрациях 1 и 10 мкМ приводила к существенному снижению уровня Ca^{2+} в цитоплазме

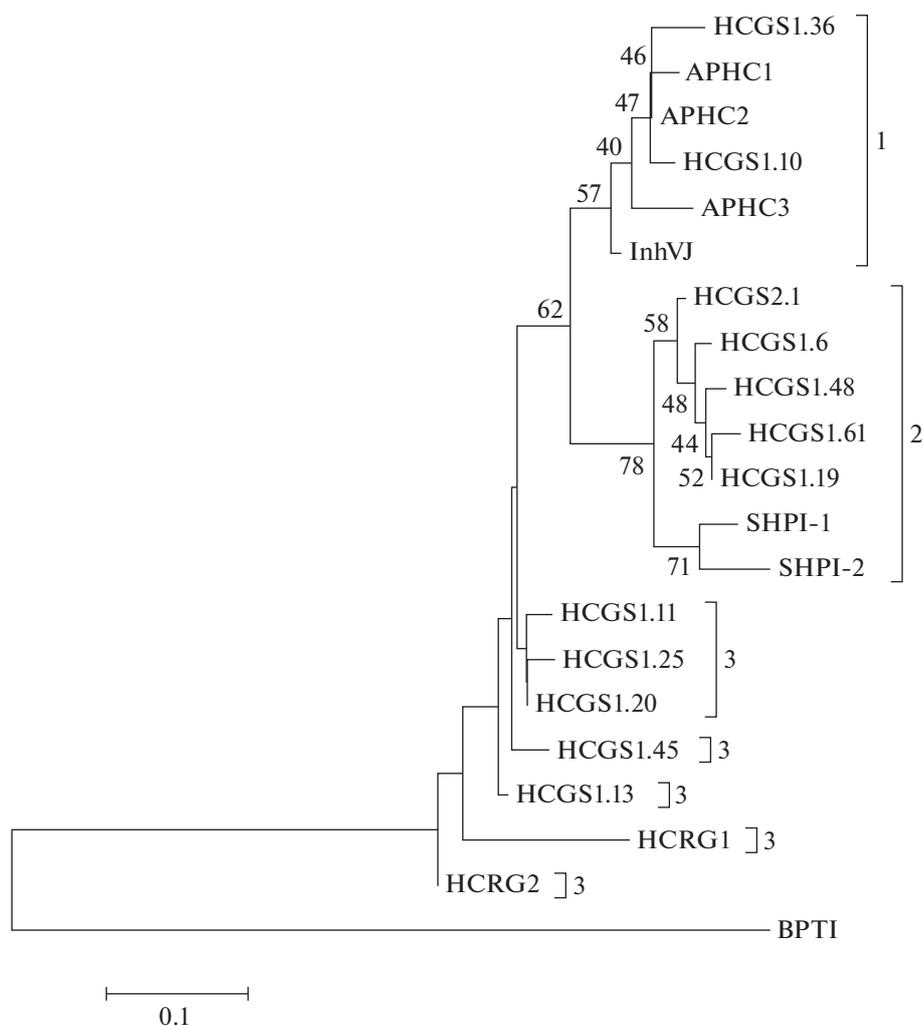


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное методом ближайших соседей на основе последовательностей ингибиторов протеаз Кунитц-типа: InhVJ [12], HCRG1, HCRG2 [14], APHC1 – APHC3 [3, 8, 17] из *H. crispus*; HCGS1.11, HCGS 1.25, HCGS 1.45, HCGS 1.13, HCGS 1.19, HCGS 1.19, HCGS2.1, HCGS1.6, HCGS1.48, HCGS1.61, HCGS1.10, HCGS1.36 [16] – пептиды, выведенные на основании последовательности κДНК *H. crispus*; SHPI-1 и SHPI-2 [13] из *S. helianthus*; BPTI [18] из *Bos taurus*. Цифрами обозначены кластеры пептидов, имеющие P1-положения разные аминокислотные остатки : 1 –Thr; 2 –Arg (HCGS 1.19, HCGS2.1, HCGS1.6, HCGS1.48, HCGS1.61) и Lys (SHPI-1 и SHPI-2); 3 –Lys. В узлах дендрограммы указаны значения бутстреп-поддержки, составляющие больше 40%.

макрофагов в присутствии гистамина. Блокирующий эффект проявлялся в заметном уменьшении амплитуды кальциевого сигнала в ответ на аппликацию гистамина. Пептиды гHCGS1.19 и гHCGS1.36, как и гHCGS1.20 [19] в концентрации 10 мкМ обладали выраженной ингибирующей активностью, в то время как гHCGS1.10 был практически не активен. гHCGS1.36 проявлял в этой концентрации максимальное ингибирование Ca^{2+} -ответа клеток на гистамин; его эффективность была сопоставима с действием фексофенадина (рис. 3). В этой концентрации гHCGS1.19 и гHCGS1.36 блокировали увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ на 62.2% и 84.0% по сравнению с контролем соответственно, а эффективность гHCGS 1.10 составила

только 12.6%. Отмечено, что в концентрации 1 мкМ гHCGS1.10 и гHCGS1.19 не оказывали влияния на изменение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, тогда как гHCGS1.36 ингибировал Ca^{2+} -ответ клеток эффектора на 67.2% (рис. 3).

Несмотря на высокую идентичность последовательностей исследуемых пептидов (от 80.36 до 92.86%) наличие точечных замен в реактивном сайте (остатки 12, 14–17) и сайте слабых взаимодействий с протеазами (остатки 34 и 38) (таблица) может влиять на величину (K_i) и характер их взаимодействия с мишенями, протеазами и/или TRPV1-рецептором. Так, в 12-й позиции у HCGS1.10, HCGS1.20 и HCGS1.36 находится остаток Pro, тогда как у HCGS1.19, подобно

		P1																																																									
		1	10	20	30	40	50	56																																																			
1	InhVJ	G	S	I	C	L	E	P	K	V	V	G	F	C	T	A	Y	F	R	F	F	D	S	E	T	G	K	C	T	P	F	I	Y	G	G	C	E	G	N	G	N	N	F	E	T	L	H	A	C	R	A	I	C	R	A	-	91.07		
	APHC3	G	S	I	C	L	E	P	K	V	V	G	F	C	T	A	Y	F	R	F	F	N	S	E	T	G	K	C	T	P	F	I	Y	G	G	C	E	G	N	G	N	N	F	E	T	L	R	A	C	R	G	I	C	R	A	-	85.71		
	HCGS1.10	G	S	I	C	L	E	P	K	V	V	G	F	C	T	A	Y	L	R	R	F	F	D	S	E	T	G	K	C	T	P	F	I	Y	G	G	C	E	G	N	G	N	N	F	E	T	L	R	A	C	R	A	I	C	R	A	-	91.07	
	APHC1	G	S	I	C	L	E	P	K	V	V	G	F	C	T	A	Y	F	R	R	F	F	D	S	E	T	G	K	C	T	P	F	I	Y	G	G	C	E	G	N	G	N	N	F	E	T	L	R	A	C	R	A	I	C	R	A	-	89.29	
	APHC2	G	S	I	C	L	E	P	K	V	V	G	F	C	T	A	Y	F	R	R	F	F	D	S	E	T	G	K	C	T	P	F	I	Y	G	G	C	E	G	N	G	N	N	F	E	T	L	R	A	C	R	A	I	C	R	A	-	91.07	
2	HCGS1.36	G	S	I	C	L	E	P	K	V	V	G	F	C	T	A	Y	F	R	R	F	F	D	S	E	T	G	K	C	T	P	F	I	Y	G	G	C	E	G	N	G	N	N	F	E	T	L	R	A	C	R	A	I	C	R	A	-	87.50	
	HCGS1.19	G	S	I	C	L	E	P	K	V	V	G	F	C	T	A	Y	L	R	R	F	F	D	S	E	T	G	K	C	T	P	F	I	Y	G	G	C	E	G	N	G	N	N	F	E	T	L	H	A	C	R	A	I	C	R	A	-	87.50	
	HCGS2.1	G	S	I	C	L	E	P	K	V	V	G	F	C	T	A	Y	L	R	R	F	F	D	S	E	T	G	K	C	T	P	F	I	Y	G	G	C	E	G	N	G	N	N	F	E	T	L	H	A	C	R	A	I	C	R	A	-	89.29	
	HCGS1.6	G	S	I	C	L	E	P	K	V	V	G	F	C	T	A	Y	F	R	R	F	F	D	S	E	T	G	K	C	T	P	F	I	Y	G	G	C	E	G	N	G	N	N	F	E	T	L	H	A	C	R	A	I	C	R	A	-	87.50	
	HCGS1.48	G	S	I	C	L	E	P	K	V	V	G	F	C	T	A	Y	F	R	R	F	F	D	S	E	T	G	K	C	T	P	F	I	Y	G	G	C	E	G	N	G	N	N	F	E	T	L	H	A	C	R	A	I	C	R	A	-	87.50	
	HCGS1.61	G	S	I	C	L	E	P	K	V	V	G	F	C	T	A	Y	F	R	S	F	F	D	S	E	T	G	K	C	T	P	F	I	Y	G	G	C	E	G	N	G	N	N	F	E	T	L	H	A	C	R	A	I	C	R	A	-	85.71	
	SHPI-1	-	S	I	C	L	E	P	K	V	V	G	F	C	T	A	Y	L	R	R	F	F	D	S	E	T	G	K	C	T	P	F	I	Y	G	G	C	E	G	N	G	N	N	F	E	T	L	H	Q	C	R	A	I	C	R	A	-	85.45	
	SHPI-2	-	S	F	C	L	E	P	K	V	V	G	F	C	T	A	Y	L	R	R	F	F	D	S	E	T	G	K	C	T	P	F	I	Y	G	G	C	E	G	N	G	N	N	F	E	T	L	H	Q	C	R	A	I	C	R	A	-	83.64	
	HCRG1	R	G	I	C	S	E	P	K	V	V	G	F	C	T	A	Y	L	R	R	F	F	D	S	E	T	G	E	C	K	P	F	I	Y	G	G	C	K	G	N	K	N	N	F	E	T	L	H	A	C	R	G	I	C	R	A	-	92.86	
	HCRG2	R	G	I	C	L	E	P	K	V	V	G	F	C	T	A	Y	L	R	R	F	F	D	S	E	T	G	K	C	T	P	F	I	Y	G	G	C	E	G	N	G	N	N	F	E	T	L	H	A	C	R	G	I	C	R	A	-	80.36	
3	HCGS1.20	G	S	I	C	L	E	P	K	V	V	G	F	C	T	A	Y	L	R	R	F	F	D	S	E	T	G	K	C	T	P	F	I	Y	G	G	C	E	G	N	G	N	N	F	E	T	L	H	A	C	R	A	I	C	R	A	-	100	
	HCGS1.11	G	S	I	C	L	E	P	K	V	V	G	F	C	T	A	Y	L	R	R	F	F	D	S	E	T	G	K	C	T	P	F	I	Y	G	G	C	E	G	N	G	N	N	F	E	T	L	H	A	C	R	A	I	C	R	A	-	98.21	
	HCGS1.25	G	S	I	C	L	E	P	K	V	V	G	F	C	T	A	Y	L	R	R	F	F	D	S	E	T	G	K	C	T	P	F	I	Y	G	G	C	E	G	N	G	N	N	F	E	T	L	H	A	C	R	A	I	C	R	A	-	98.21	
	HCGS1.45	G	S	I	C	L	E	P	K	V	V	G	F	C	T	A	Y	L	R	R	F	F	D	S	E	T	G	K	C	T	P	F	I	Y	G	G	C	K	G	N	K	N	N	F	E	T	L	H	A	C	R	A	I	C	R	A	-	96.43	
	HCGS1.13	G	S	I	C	L	E	P	K	V	V	G	F	C	T	A	Y	L	R	R	F	F	D	S	E	T	G	K	C	T	P	F	I	Y	G	G	C	E	G	N	G	N	N	F	E	T	L	H	A	C	R	A	I	C	R	A	-	98.21	
	BPTI	R	P	D	F	C	L	E	P	P	Y	T	G	F	C	T	A	Y	L	R	R	F	F	D	S	E	T	G	K	C	T	P	F	I	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	K	S	A	E	D	C	M	R	T	C	G	G	A	-

Рис. 2. Аминокислотные последовательности ингибиторов протеаз Кунитц-типа, представленных на филогенетическом дереве (рис. 1). P1 – аминокислотный остаток реактивного сайта ингибиторов. Аминокислотные остатки ингибиторов, соответствующие реактивному сайту и сайту слабых взаимодействий с протеазами, отмечены звездочками. Консервативные аминокислотные остатки представлены на сером фоне. Идентичные остатки показаны белым шрифтом на черном фоне. Процент идентичности (правый столбец) рассчитан относительно последовательности HCGS1.20. Слева фигурными скобками объединены последовательности пептидов, входящих в кластеры 1 – 3 согласно рис. 1.

SHPI-1, остаток Arg, функционально значимый для связывания ингибиторов Кунитц-типа активных с аспарагиновыми и цистеиновыми протеазами [2]. Как уже было отмечено ранее, пептиды отличаются аминокислотными остатками в P1-положении (14): Thr – у HCGS1.10 и HCGS1.36, Arg – у HCGS1.19 и Lys – у HCGS1.20, что хорошо согласуется со значениями констант ингибирования для этих пептидов (таблица). Более того, аминокислотные остатки Tyr16 и Phe17, очевидно, вносят вклад в изменение сродства к протеазам, что было показано для HCGS- и HCRG-пептидов [12, 14]. Следует отметить, что последовательность HCGS1.36 отличается от HCGS1.10 только двумя заменами – Leu17Phe и Tyr34His (рис. 2), которые, возможно, и играют ключевую роль в проявлении антигистаминной активности гHCGS1.36.

По-видимому, противовоспалительный эффект, связанный с ингибированием пептидами увеличения $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах под действием гистамина, может являться результатом как опосредованных реакций взаимодействия пептидов с протеазами, вовлеченными в эти процессы, так и следствием блокирования гистаминовых рецепторов H₁-типа, которое препятствует их взаимо-

действию с агонистом. Таким образом, полученные данные позволяют рассматривать исследуемые пептиды, гHCGS1.19 и гHCGS1.36, в качестве потенциальных противовоспалительных соединений, способных эффективно снижать действие такого мощного медиатора воспаления как гистамин в экспериментах *in vitro*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали следующие реактивы: флуоресцентные зонды Fluo-3/AM (Invitrogen, США); гистамин, фексофенадин (Sigma, США), Miniprep Kit для выделения плазмид, эндонуклеазы рестрикции (Fermentas, Литва), Ni-NTA-агароза (Qiagen, Нидерланды), компоненты сред для культивирования бактерий (Difco, США), штаммы XL-1 Blue (Stratagene, США), BL21(DE3) *E. coli* (Novagen, Германия). Олигонуклеотиды синтезированы фирмой ЗАО “Евроген” (Россия). Растворы готовили на деионизованной воде MilliQ.

Поиск гомологичных последовательностей проводили с помощью сервера BLAST [25]. Множественное выравнивание и филогенетический анализ аминокислотных последовательностей

Структурно-функциональные характеристики ингибиторов протеаз из актиний *Heteractis crispa* и *Stichodactyla helianthus*

Источник	Пептид	Реактивный (основной) сайт связывания, участок 11–16							Сайт слабых взаимодействий (дополнительный сайт связывания), участок 33–38						K_i трипсина, М	Молекулярная масса, Да
		11	12	13	14	15	16	17	33	34	35	36	37	38		
<i>H. crispa</i>	HCGS1.10	G	P	C	T	A	Y	L	I	Y	G	G	C	E	2.1×10^{-7}	6151
	HCGS1.36	G	P	C	T	A	Y	F	I	H	G	G	C	E	1×10^{-7}	6176
	HCGS1.19	G	R	C	R	G	S	F	I	Y	G	G	C	G	3×10^{-8}	6088
	HCGS1.20 [19]	G	P	C	K	A	R	I	I	Y	G	G	C	G	2.1×10^{-8}	6080
	HCRG1 [14]	G	P	C	K	A	G	L	I	Y	G	G	C	K	2.8×10^{-8}	6196
	HCRG2 [14]	G	P	C	K	A	R	I	I	Y	G	G	C	G	5×10^{-8}	6148
	InhVJ [12]	G	P	C	T	A	Y	F	I	Y	G	G	C	E	7.38×10^{-8}	6106
	APHС1 [3]	G	P	C	T	A	Y	F	I	Y	G	G	C	E	1×10^{-6}	6187
	APHС2 [8]	G	P	C	T	A	Y	F	I	Y	G	G	C	E	9×10^{-7}	6185
APHС3 [17]	G	P	C	T	A	Y	F	I	Y	G	G	C	E	5×10^{-7}	6111	
<i>S. helianthus</i>	SHPI-1 [2]	G	R	C	K	G	Y	F	I	Y	G	G	C	G	1.1×10^{-10}	6110

осуществляли с помощью программного обеспечения Vector NTI Advance 11 (Invitrogen, США) и MEGA 6 [26]. При построении филогенетического дерева методом ближайших соседей (NJ) использовали коррекцию Пуассона (Poisson correction). Достоверность филогенетического дерева оценивали “bootstrap” тестом (1000 реплик) [26].

Нуклеотидную последовательность рекомбинантных плазмид определяли с использованием стандартных T7-праймеров по методу Сэнгера на генетическом анализаторе ABI 3130 × 1 (Applied Biosystems, США) по программе производителя.

Молекулярные массы полипептидов определяли на времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex III TOF/TOF (Bruker Daltonics, Германия); масс-спектры фиксировали в прямом пролете и режиме рефлектора.

Аминокислотные последовательности N-концевых фрагментов модифицированных рекомбинантных пептидов определяли на автоматическом твердофазном аминокислотном секвенаторе белков Procise 492 cLC (Applied Biosystems, США) по методике производителя.

Получение рекомбинантных плазмид для экспрессии в *E. coli* генов *hcs* 1.10, *hcs* 1.19 и *hcs* 1.36, кодирующих пептиды. Клонирование рекомбинантных ДНК осуществляли стандартными методами в клетках *E. coli* XL-1 Blue. Амплификацию генов с помощью ПЦР проводили с использова-

нием Go-Taq-полимеразы в условиях, рекомендованных производителем фермента (Promega, США). Для получения экспрессионных конструкций фрагменты ДНК, кодирующие зрелые пептиды, были амплифицированы с генспецифичными праймерами как описано [19]. Полученные ПЦР-продукты клонированы по сайтам рестрикции EcoRI и XhoI в вектор pET32b(+), содержащий ген тиоредоксина для корректного замыкания дисульфидных связей. Плазмиды с корректной вставкой использовали для трансформации клеток штамма BL21(DE3) *E. coli* путем электропорации на приборе Multiporator (Eppendorf, Германия).

Получение рекомбинантных пептидов. Трансформированные клетки культивировали в 1 л среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, при 37°C до достижения оптической плотности A_{600} 0.6–0.8. Для индукции экспрессии добавляли изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (IPTG) в конечной концентрации 0.2 мМ и продолжали наращивать клетки в течение 16–18 ч при температуре 18°C для получения рекомбинантных пептидов в растворимой форме. Бактериальные клетки осаждали из раствора центрифугированием при 8000 об/мин в течение 8 мин.

Гибридный белок, содержащий тиоредоксин и целевой пептид, выделяли методом металлоаффинной хроматографии на Ni²⁺-NTA-агарозе в нативных условиях (0.02 М Трис-HCl (pH 7.8),

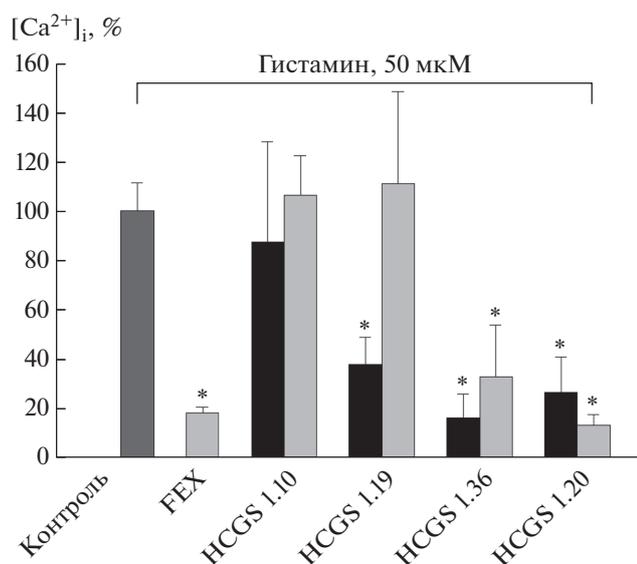


Рис. 3. Влияние гистамина (50 мкМ), фексофенадина (FEX, 10 мкМ) и пептидов гHCGS1.10, гHCGS1.19, гHCGS1.20 [19] и гHCGS1.36 в концентрациях 10 мкМ (черные столбцы) и 1 мкМ (серые столбцы) на содержание внутриклеточного Ca²⁺ в макрофагах костного мозга мыши. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение ($n = 4$). * $p < 0.05$.

0.4 М NaCl, 10 мМ имидазол) из растворимой фракции клеточного лизата после его обработки ультразвуком по инструкции производителя (Bandelin, Германия). Отщепление тиоредоксина проводили бромцианом по модифицированной методике [27]. Очистку рекомбинантных пептидов осуществляли с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Jupiter C₄ 10 × 250 мм (Phenomenex, США), в градиенте концентрации ацетонитрила в 0.1% TFA, pH 2.2, от 0 до 70% за 70 мин, со скоростью потока 3 мл/мин. Время удерживания целевого продукта составило 29, 35 и 38 мин для гHCGS1.19, гHCGS1.36 и гHCGS1.10 соответственно. По данным MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа молекулярная масса пептидов составила 6088, 6150 и 6176 Да для HCGS1.19, HCGS1.10 и HCGS1.36 соответственно, что соответствует расчетным данным.

Для восстановления дисульфидных связей к раствору 100 мкг рекомбинантного пептида в 70 мкл 6 М раствора гуанидингидрохлорида в 0.5 М Трис-НСl (pH 8.5), содержащем 2 мМ EDTA, добавляли 2 мкл 1.4 М раствора дитиотреитола и инкубировали реакционную смесь 4 ч при 40°C. Тиольные группы цистеиновых остатков модифицировали с использованием 4-винилпиридина, добавляя 2 мкл 50% раствора в изопропанол и выдерживая реакционную смесь в течение 20 мин при комнатной температуре в темноте.

Продукт очищали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Nucleosil C₁₈ (4.6 × 250 мм, Supelco, США) в градиенте концентрации ацетонитрила от 10 до 70% в 0.1% TFA, pH 2.2, в течение 160 мин при скорости элюции 0.5 мл/мин.

Определение констант ингибирования активности трипсина. К 10 мкл 0.2 мкМ раствора трипсина в 50 мМ растворе Трис-НСl, pH 8.0, добавляли исследуемый пептид в концентрации от 0.008 до 7.0 мкМ, после чего объем реакционной смеси доводили буферным раствором до 150 мкл и инкубировали в течение 10 мин при 37°C. Далее вносили по 50 мкл раствора субстрата в 50 мМ Трис-НСl, pH 8.0, содержащем 10% DMF. В качестве субстрата для трипсина использовали гидрохлорид *N*-бензоил-*DL*-аргинин-*para*-нитроанилида (BAPNA) в концентрациях 0.6 и 1.2 мМ. Константы определяли по методу Диксона [22] через 30 мин инкубации при 37°C, измеряя оптическое поглощение образовавшегося *para*-нитроанилина при 410 нм на планшетном ридере xMark (BioRad, США). Константы рассчитывали по данным трех параллельных экспериментов, пределы расчетной ошибки составили 0.1–0.5%.

Макрофаги из клеток красного костного мозга получали согласно стандартной процедуре [28]. Стерильно выделенные бедренные кости мышей линии Balb/c помещали в чашку Петри с питательной средой DMEM и ставили на лед. Кости отчищали от мышц, отрезали эпифизы и вымывали костный мозг из полости кости с помощью шприца средой DMEM. Полученные фрагменты костного мозга ресуспендировали пипетированием в культуральной среде следующего состава: 50% среды DMEM, содержащей *L*-глутамин; 30% кондиционной среды DMEM, полученной в результате культивирования в ней фибробластов мыши L929; 20% лошадиной сыворотки крови. Суспензию клеток разливали в неадгезивные пластиковые чашки Петри и инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в течение 7 сут до достижения полной дифференцировки клеток.

Содержание внутриклеточного Ca²⁺ в макрофагах костного мозга мыши измеряли стандартным методом с незначительной модификацией [29]. Культуру макрофагов костного мозга промывали раствором 10 мМ фосфатно-солевого буфера, pH 7.4, клетки смывали интенсивным пипетированием и вносили в лунки 96-луночного планшета в количестве 5 × 10³ 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 мМ NaCl; 10 мМ глюкоза; 5 мМ KCl; 0.8 мМ MgCl₂; 2 мМ CaCl₂; 10 мМ HEPES, pH 7.4, и далее инкубировали при 37°C в течение 40 мин. Затем клеточный моно-

слой 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 20 мкл раствора гистамина (50 мкМ) и регистрировали изменение интенсивности флуоресценции в течение 1–3 мин. Для исследования блокирующего действия пептидов гHCGS1.10, гHCGS1.19, гHCGS1.36 и фексофенадина клетки, нагруженные флуоресцентным зондом, предварительно инкубировали в течение 30 мин в присутствии указанных соединений (1 и 10 мкМ). Измерение интенсивности флуоресценции проводили при $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 485 \text{ нм}/520 \text{ нм}$ с помощью флуоресцентного фотометра планшетного формата PHERAstar FS (BMG Labtech, Германия). За 100% принимали максимальную интенсивность флуоресценции контрольных клеток, увеличенную в присутствии гистамина.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам ТИБОХ ДВО РАН: к.б.н. О.В. Черникову за секвенирование N-концевой аминокислотной последовательности, к.х.н. С.Д. Анастюку за проведение масс-спектрометрического анализа, к.х.н. В.М. Табакмахеру за помощь в создании рекомбинантных плазмид.

Работа поддержана грантом Российского Научного Фонда № 14-25-00037.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bosman M., Royston D.* // *Expert Opin. Drug Saf.* 2008. V. 7. P. 663–677.
2. *García-Fernández R., Peigneur S., Pons T., Alvarez C., González L., Chávez M.A., Tytgat J.* // *Toxins.* 2016. V. 8. № 110. P. 2–17. doi 10.3390/toxins8040110
3. *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.
4. *Shigetomi H., Onogi A., Kajiwara H., Yoshida S., Furukawa N., Haruta S., Tanase Y., Kanayama S., Noguchi T., Yamada Y., Oi H., Kobayashi H.* // *Inflamm. Res.* 2010. V. 59. P. 679–687.
5. *Mourão, C.B.F., Schwartz E.F.* // *Mar. Drugs.* 2013. V. 11. P. 2069–2112.
6. *Inoue N., Ikawa M., Isotani A., Okabe M.* // *Nature.* 2005. V. 434. P. 234–238.
7. *Schweitz H., Bruhn T., Guillemare E., Moinier D., Lancelin J.M., Beress L., Lazdunski M.* // *J. Biol. Chem.* 1995. T. 270. C. 25121–25126.
8. *Козлов С.А., Андреев Я.А., Мурашев А.Н., Скобцов Д.И., Дьяченко И.А., Гришин Е.В.* // *Биоорган. химия.* 2009. Т. 35. С. 789–798. [*Kozlov S.A., Andreev Ya. A., Murashev A.N., Skobtsov D.I., D'yachenko I.A., and Grishin E.V.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 2009. V. 35. P. 711–719.]
9. *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., Koleznikov S.S., Grishin E.V.* // *Mar. Drugs.* 2013. V. 11. P. 5100–5115.
10. *Зыкова Т.А., Винокуров Л.М., Маркова Л.Ф., Козловская Э.П., Еляков Г.Б.* // *Биоорган. химия.* 1985. V. 11. P. 293–301.
11. *Сокотун И.Н., Лейченко Е.В., Вакорина Т.И., Еськов А.А., Ильина А.П., Монастырская М.М., Козловская Э.П.* // *Биоорган. химия.* 2007. Т. 33. С. 448–455. [*Sokotun I.N., Leichenko E.V., Vakorina T.I., Es'kov A.A., Il'ina A.P., Monastyrnaia M.M., Kozlovskaja E.P.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2007. V. 33. P. 415–422.]
12. *Gladkikh I., Monastyrnaya M., Leychenko E., Zelepuga E., Chausova V., Isaeva M., Anastuyuk S., Andreev Y., Peigneur S., Tytgat J., Kozlovskaya E.* // *Mar. Drugs.* 2012. V. 10. P. 1545–1565.
13. *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.
14. *Gladkikh I., Monastyrnaya M., Zelepuga E., Sintsova O., Tabakmakher V., Gnedenko O., Ivanov A., Hua K-F., Kozlovskaya E.* // *Mar. Drugs.* 2015. V. 13. P. 6038–6063.
15. *Сокотун И.Н., Ильина А.П., Монастырская М.М., Лейченко Е.В., Еськов А.А., Анастюк С.Д., Козловская Э.П.* // *Биохимия.* 2007. Т. 72. С. 368–374. [*Sokotun I.N., Il'ina A.P., Monastyrnaya M.M., Leichenko E.V., Es'kov A.A., Anastuyuk S.D., Kozlovskaya E.P.* // *Biokhimiya.* 2007. V. 72. P. 368–374.]
16. *Isaeva M.P., Chausova V.E., Zelepuga E.A., Guzev K.V., Tabakmakher V.M., Monastyrnaya M.M., Kozlovskaya E.P.* // *Peptides.* 2012. V. 34. P. 88–97.
17. *Дьяченко И.А., Андреев Я. А., Логашина Ю.А., Мурашов А. Н., Гришин Е.В.* // *Докл. АН.* 2015. Т. 465. С. 252–254. [*Dyachenko I.A., Andreev Ya.A., Logashina Yu.A., Murashev A.N., Grishin E.V.* // *Dokl. AS.* 2015. V. 465. P. 279–281.]
18. *Vincent J.-P., Lazdunski M.* // *Biochemistry.* 1972. V. 11. P. 2967–2977.
19. *Синцова О.В., Монастырская М.М., Пислягин Е.А., Менчинская Е.С., Лейченко Е.В., Аминин Д.Л., Козловская Э.П.* // *Биоорган. химия.* 2015. Т. 41. С. 657–663. [*Sintsova O.V., Monastyrnaya M.M., Pisl'yagin E.A., Menchinskaya E.S., Leychenko E.V., Aminin D.L., Kozlovskaya E.P.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2015. V. 41. P. 590–596.]
20. *Зелепуга Е.А., Табакмахер В.М., Чаусова В.Е., Монастырская М.М., Исаева М.П., Козловская Э.П.* // *Биоорган. химия.* 2012. Т. 38. С. 185–198. [*Zelepuga E.A., Tabakmakher V.M., Chausova V.E., Monastyrnaya M.M., Isaeva M.P., Kozlovskaya E.P.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2012. V. 38. P. 159–170.]
21. *Табакмахер В.М., Синцова О.В., Кривошатко О.Н., Зелепуга Е.А., Монастырская М.М., Козловская Э.П.* // *Докл. АН.* 2015. Т. 461. С. 232–235. [*Tabakmakher V.M., Sintsova O.V., Krivoshapko O.N., Zelepuga E.A., Monastyrnaya M.M., Kozlovskaya E.P.* // *Dokl. AS.* 2015. V. 461. P. 80–83.]

22. Dixon M. // Biochem. J. 1953. V. 55. P. 170–171.
23. Aldridge C., Razzak A., Babcock T.A., Helton W.S., Espat N.J. // J. Surg. Res. 2008. V. 149. P. 296–302.
24. Shahid M., Tripathi T., Sobia F., Moin S., Siddiqui M., Khan R. A. // The Open Immunol. J. 2009. V. 2. P. 9–41.
25. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.
26. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. // Mol. Biol. Evol. 2013. V. 30. P. 2725–2729.
27. Andreev Y.A., Kozlov S.A., Vassilevski A.A., Grishin E.V. // Analytical Biochem. 2010. V. 407. P. 144–146.
28. Zhang X., Goncalves R., Mosser D.M. // Curr Protoc Immunol (John Wiley & Sons, Inc). 2008. CHAPTER: Unit–14.1. P. 1–17. doi 10.1002/0471142735.im1401s83
29. Heding A. // Application Note. 2004. № 104. Rev. 04. P. 1–2. <http://www.bmglabtech.com/media/35216/1044006.pdf>.

Kunitz-type Peptides of the Sea Anemone *Heteractis crispa* – Potential Anti-inflammatory Compounds

**O. V. Sintsova*, E. A. Pislyagin*, I. N. Gladkikh*, M. M. Monastyrnaya*, E. S. Menchinskaya*,
E. V. Leychenko^{#, *, **}, D. L. Aminin*, and E. P. Kozlovskaya***

[#]Phone: +7 (908) 440-62-68; e-mail: 969844@gmail.com

^{*}G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, 159,
Prosp. 100 let Vladivostoku, Vladivostok 690022 Russia

^{**}School of Natural Sciences, Far Eastern Federal University ~~8 Sukhanova St.~~ Vladivostok, 690950, Russia

Antihistamine activity of recombinant peptides, Kunitz-type serine protease inhibitors of the sea anemone *Heteractis crispa* was studied. It was shown that the peptides rHCGS1.19 and rHCGS1.36 at a concentration 10 mkM inhibit the increase of the calcium ions concentration in macrophages elicited by histamine on 62.2% and 84.0%, respectively. The anti-inflammatory effect can be as the result of mediated reactions between peptides and proteases involved in these processes, as the histamine H₁-type receptor blocking.

Keywords: sea anemone, Kunitz-type protease inhibitors, antihistamine activity