

УДК 577.1+577.2+577.3

НОВЫЕ МИШЕНИ ПЕПТИДА КУНИТЦ-ТИПА АКТИНИИ *Heteractis magnifica*

А. Н. Кветкина^{1,*}, Л. А. Калужский², Е. В. Лейченко^{1,3},
М. П. Исаева¹, А. С. Иванов², Э. П. Козловская¹

Представлено академиком РАН В.А. Стоником 12.03.2019 г.

Поступило 15.03.2019 г.

Методом поверхностного плазмонного резонанса исследовано взаимодействие пептида Кунитц-типа, НМИQ3с1, актинии *Heteractis magnifica* с некоторыми сериновыми протеазами, в том числе с протеазами воспаления. Показано, что рекомбинантный пептид образует прочные комплексы с трипсином ($K_D = 1,07 \cdot 10^{-9}$ М) и химотрипсином ($K_D = 4,70 \cdot 10^{-8}$ М). Анализ термодинамических параметров комплекса НМИQ3с1/химотрипсин выявил существенный вклад энтропийного фактора в реакцию комплексообразования. Образование специфических комплексов с калликреином ($K_D = 2,81 \cdot 10^{-8}$ М) и эластазой ($K_D = 1,11 \cdot 10^{-7}$ М) указывает на возможную противовоспалительную активность и создаёт перспективы использования исследуемого пептида как потенциального терапевтического агента.

Ключевые слова: актиния, пептид Кунитц-типа, сериновые протеазы, *Heteractis magnifica*.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524872221-224>

Сериновые протеазы, сгруппированные согласно принятой классификации в 13 кланов и 40 семейств, составляют более трети всех известных протеолитических ферментов [1]. Самым большим и наиболее охарактеризованным является семейство S1 сериновых протеаз клана PA, к которому относятся химотрипсин-подобные ферменты. Они играют ключевую роль в пищеварении и регулируют многие физиологические процессы, включая свёртываемость крови, фибринолиз, оплодотворение, апоптоз, воспаление и др., посредством запуска различных сигнальных путей. Передача сигнала путём расщепления внеклеточными протеазами различных мишеней имеет важное значение в патогенезе широкого спектра заболеваний, таких как артрит, рак, нейродегенеративные и сердечно-сосудистые. В качестве мишеней протеаз выступают предшественники рецепторов, активируемых протеазами, рецепторов интегринов и белков адгезии, рецепторов инсулина и других ростовых факторов, а также ионных каналов [2].

Контроль активности сериновых протеаз осуществляется за счёт регулирования экспрессии/секреции, активации проферментов и различных ингибиторов. Из белковых ингибиторов наиболее изученными являются пептиды Кунитц-типа. Их аминокислотная последовательность состоит из ~60 аминокислотных остатков, компактная $\alpha + \beta$ укладка фолда стабилизирована тремя консервативно расположенными дисульфидными связями [3].

Интерес к ингибиторам сериновых протеаз Кунитц-типа обусловлен широкой представленностью этих пептидов в живых организмах, а также их структурным разнообразием и мультитаргетностью. Известный ингибитор сериновых протеаз Кунитц-типа — бычий панкреатический ингибитор трипсина (ВРТИ, апротинин) — широко применяется в медицине в качестве антипротеолитического, антифибринолитического и гемостатического препарата благодаря способности ингибировать трипсин, химотрипсин, калликреин, плазмин и другие протеазы [4]. Актинии, морские животные, относящиеся к типу Кишечнополостные, являются богатым источником пептидов Кунитц-типа. Некоторые из них, как было показано в различных экспериментах, кроме сериновых протеаз проявляют сродство к другим клеточным мишеням. Так, AsKC1–AsKC3 из *Anemonia sulcata* и ShPI-1 из *Stichodactyla helianthus* являются блокаторами потенциал-зависимых калиевых каналов [5, 6]. Пептиды APHC1–APHC3

¹ Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской Академии наук, Владивосток

² Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

³ Дальневосточный федеральный университет, Владивосток

*E-mail: kvetkina@gmail.com

и HCRG21 из *Heteractis crista* взаимодействуют с рецептором TRPV1, ингибируя капсаицин-индуцированные токи [7, 8].

В транскриптомах актиний *H. crista* и *Heteractis magnifica* нами были обнаружены мультигенные семейства, кодирующие пептиды Кунитц-типа, которые представлены в ядовитом секрете в виде комбинаторных библиотек [9, 10]. Все исследованные нами пептиды Кунитц-типа являются ингибиторами трипсина, некоторые из них проявляют антигистаминную и противовоспалительную активность [11, 12]. Рекомбинантный аналог пептида актинии *H. magnifica*, HMIQ3c1 обладал нейропротективной активностью в *in vitro* модели β -амилоид-индуцированной цитотоксичности на клетках нейробластомы мыши. Механизм цитопротективной активности этого пептида, возможно, связан с ингибированием протеаз, вызывающих окислительный стресс и воспаление [12].

С целью выявления биологических мишеней в настоящей работе проведено исследование взаимодействия HMIQ3c1 с некоторыми сериновыми протеазами PA-клана. Пептид был получен в составе гибридного белка с тиоредоксином и полигистидиновой последовательностью как продукт экспрессии гена в бактериальной системе. Для высвобождения целевого пептида гибридный белок был выделен с помощью металл-аффинной хроматографии, обработан бромцианом для отщепления пептида по остатку метионина и очищен методом обращённо-фазовой ВЭЖХ. Выход целевого пептида составил 7,9 мг/л клеточной культуры. Молекулярная масса пептида, по данным MALDI-TOF MS, составила 6434 Да, что соответствует расчётной [12].

Взаимодействие HMIQ3c1 с сериновыми протеазами было исследовано методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на оптическом биосенсоре Biacore 3000 ("GE Healthcare", США). Пептид был иммобилизован на карбоксиметилированной подложке чипа CM4 ("GE Healthcare"), активированной смесью NHS/EDC (N-гидроксисукцинимид/1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодимид гидрохлорид), путём инъекции раствора ингибитора HMIQ3c1 (100 мкг/мл) в 10 mM растворе ацетата натрия (pH 5,5) в течение 10 мин со скоростью потока 5 мкл/мин. Количество иммобилизованного пептида составило порядка 600 RU (resonance units, 1 RU соответствует 1 пг пептида). Растворы ферментов в концентрациях от 10 до 500 нМ пропускали через измерительный и контрольный каналы биосенсора при температуре 25 °C в течение 5 мин при скорости потока 5 мкл/мин. Последу-

ющий распад комплексов регистрировали в течение не менее 10 мин. Согласно полученным данным HMIQ3c1 взаимодействовал с трипсином (Тр), химотрипсином (ХТр), панкреатическим калликреином (КЛК) и эластазой нейтрофилов человека (ЭНЧ), рис. 1. Расчёт констант скорости ассоциации k_a и диссоциации k_d комплексов ферментов с пептидом, а также равновесных констант ассоциации K_A и диссоциации K_D этих комплексов был выполнен на основе данных, полученных при температуре 25 °C. По величине K_A комплексы распределяются в следующем порядке: трипсин > калликреин > химотрипсин > эластаза. Полученные данные свидетельствуют об образовании достаточно прочных комплексов и исключают неспецифическое связывание (табл. 1). Высокая ингибирующая активность HMIQ3c1 в отношении трипсина ($K_i = 5,0 \times 10^{-8}$ М) [12] подтверждает образование прочного комплекса пептида с этим ферментом. Значение константы диссоциации комплекса HMIQ3c1 с трипсином оказалось на порядок ниже значения K_D для InhVJ ($7,38 \cdot 10^{-8}$ М), пептида Кунитц-типа из актинии *H. crista* [13]. Подобная картина наблюдалась и для комплексов этих пептидов с химотрипсином (табл. 1).

Для комплекса HMIQ3c1_{imm}/химотрипсин были определены термодинамические характеристики. Температурная зависимость K_D была исследована в диапазоне от 10 до 40 °C с интервалом 5 °C. Значение изменения энергии Гиббса при 298 К (ΔG) в ходе взаимодействия было получено из уравнения

$$\Delta G = RT \ln(K_D), \quad (1)$$

где ΔG — изменение энергии Гиббса, R — универсальная газовая постоянная, T — абсолютная температура, K_D — равновесная константа диссоциации комплекса. По уравнению

$$\ln(K_D) = f(1/T) \quad (2)$$

были построены графики Вант-Гоффа, изменение энтальпии (ΔH) в ходе взаимодействия молекул было получено как значение тангенса угла наклона графика. Значение изменения энтропии ΔS в ходе взаимодействия было получено из уравнения Вант-Гоффа

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S. \quad (3)$$

Значения изменения энтальпии и энтропии в ходе взаимодействия составили 8,13 ккал/моль и 60,8 кал/(моль·К) соответственно. Согласно уравнению (3), основным фактором, вносящим существенный вклад в образование комплекса, является энтропия. Таким образом, пептид HMIQ3c1, как

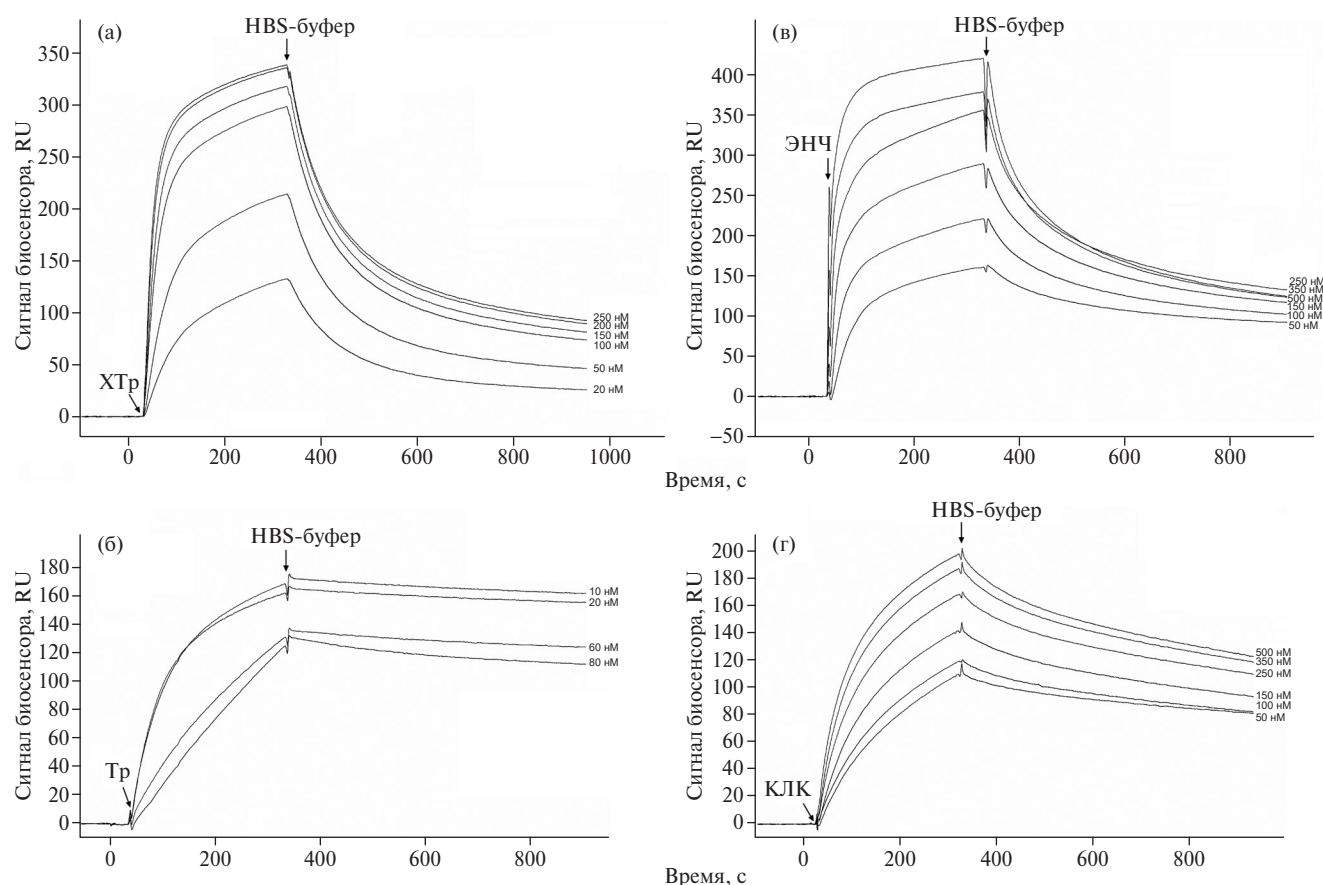


Рис. 1. Сенсограммы взаимодействия химотрипсина (ХТр, А), трипсина (Тр, Б), эластазы нейтрофилов человека (ЭНЧ, В) и панкреатического калликреина (КЛК, Г) с иммобилизованным НМІQ3с1. Справа указаны концентрации ферментов.

и исследованный ранее InhVJ (табл. 1), образует энтропийно-зависимые комплексы с химотрипсином, а положительные значения изменения энтальпии свидетельствуют о возможных разрывах водородных и электростатических связей или конформационных изменениях молекул при образовании комплекса [14].

Способность пептидов Кунитц-типа взаимодействовать с сериновыми протеазами во многом зависит от аминокислотного остатка в Р1-положении основного протеаз-связывающего сайта, который образует большое количество контактов с активным центром фермента. В Р1-положении НМІQ3с1 и ВРТІ находятся остатки Arg и Lys соответственно,

тогда как у InhVJ — остаток Thr. Интересно, что замена остатка Lys на Arg в Р1-положении ВРТІ приводила к увеличению свободной энергии ассоциации комплекса с трипсином, в то время как замена на другие аминокислотные остатки в этом положении снижали её [15]. Несмотря на широкое использование ВРТІ в медицине, применение его в качестве ингибитора ферментов поджелудочной железы в настоящее время приостановлено вследствие высокой аффинности к ферменту. Поэтому поиск новых ингибиторов ферментов является актуальной исследовательской задачей и пептиды Кунитц-типа актиний могут стать перспективными кандидатами. Кроме того, взаимодействие НМІQ3с1 с протеазами

Таблица 1. Кинетические и термодинамические параметры взаимодействия НМІQ3с1 и InhVJ с сериновыми протеазами

Пептид	Фермент	$k_a, M^{-1} \cdot s^{-1}$	k_d, s^{-1}	K_A, M^{-1}	K_D, M	ΔH , ккал/моль	ΔS , кал/(моль·К)
НМІQ3с1	Трипсин	$1,42 \cdot 10^5$	$1,52 \cdot 10^{-4}$	$9,36 \cdot 10^8$	$1,07 \cdot 10^{-9}$	н.о.	н.о.
	Химотрипсин	$1,50 \cdot 10^4$	$7,07 \cdot 10^{-3}$	$2,13 \cdot 10^7$	$4,70 \cdot 10^{-8}$	8,13	60,8
	Калликреин	$2,56 \cdot 10^4$	$7,18 \cdot 10^{-4}$	$3,56 \cdot 10^7$	$2,81 \cdot 10^{-8}$	н.о.	н.о.
	Эластаза	$5,28 \cdot 10^4$	$5,85 \cdot 10^{-3}$	$9,03 \cdot 10^6$	$1,11 \cdot 10^{-7}$	н.о.	н.о.
InhVJ	Трипсин	$8,56 \cdot 10^4$	$6,31 \cdot 10^{-3}$	$1,36 \cdot 10^7$	$7,38 \cdot 10^{-8}$	44,15	165,60
	Химотрипсин	$2,39 \cdot 10^4$	$2,37 \cdot 10^{-2}$	$1,01 \cdot 10^6$	$9,93 \cdot 10^{-7}$	77,29	276,30

воспаления, калликреином и эластазой может указывать на его возможную противовоспалительную активность.

Таким образом, нами было показано, что пептид Кунитц-типа актинии *H. magnifica* образует прочные комплексы с сериновыми протеазами РА клана, включая ферменты, запускающие воспалительный процесс. Дальнейшее исследование будет направлено на изучение механизма действия этого соединения в *in vitro* и *in vivo* моделях воспаления.

Источники финансирования. Оптико-биосенсорный анализ межмолекулярных взаимодействий был выполнен с использованием оборудования ЦКП “Протеом человека” (ИБМХ) и в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы (Тема 0518–2018–0003 “Исследование фармакологических мишеней, биологически активных соединений и систем их доставки в организм человека”).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rawlings N.D., Morton F.R., Kok C.Y., et al. // Nucl. Acids Res. 2007. V. 36. P. D320–D325.
2. Ramachandran R., Altier C., Oikonomopoulou K., et al. // Pharmacol. Rev. 2016. V. 68. P. 1110–1142.
3. Ranasinghe S., McManus D.P. // Dev. Comp. Immunol. 2013. V. 39. № 3. P. 219–227.
4. Waxler B., Rabito S.F. // Curr. Pharm. Des. 2003. V. 9. № 9. P. 777–787.
5. García-Fernández R., Peigneur S., Pons T., et al. // Toxins (Basel). 2016. V. 8. P. 1–17.
6. Schweitz H., Bruhn T., Guillemare E., et al. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 25121–25126.
7. Andreev Y.A., Kozlov S.A., Koshelev S.G., et al. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. № 35. P. 23914–23921.
8. Monastyrnaya M., Peigneur S., Zelepuga E., et al. // Marine Drugs. 2016. V. 14. № 12. P. 2–20.
9. Isaeva M.P., Chausova V.E., Zelepuga E.A., et al. // Peptides. 2012. V. 34. P. 88–97.
10. Sintsova O., Gladkikh I., Chausova V., et al. // J. Proteomics. 2018. V. 173. P. 12–21.
11. Синцова О.В., Пислягин Е.А., Гладких И.Н. и др. // Биоорган. химия. 2017. Т. 43. № 1. С. 105–112.
12. Кветкина А.Н., Лейченко Е.В., Юрченко Е.А. и др. // Биоорган. химия. 2018. Т. 44. № 4. С. 408–416.
13. Соколов И.Н., Гнеденко О.В., Лейченко Е.В. и др. // Биомед. химия. 2006. Т. 52. № 6. С. 595–600.
14. Stites W.E. // Chem. Rev. 1997. V. 97. № 5. P. 1233–1250.
15. Krowarsch D., Zakrzewska M., Smalas A.O., et al. // Prot. Pept. Lett. 2005. V. 12. P. 403–407.

NEW TARGETS OF KUNITZ-TYPE PEPTIDE FROM SEA ANEMONE *Heteractis magnifica*

A. N. Kvetkina¹, L. A. Kaluzhskiy², E. V. Leychenko^{1,3},
M. P. Isaeva¹, A. S. Ivanov², E. P. Kozlovskaya¹

¹ Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation

² Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russian Federation

³ Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Presented by Academician of the RAS V.A. Stonik March 12, 2019

Received March 15, 2019

The interaction of Kunitz-type peptide, HMIQ3c1, from sea anemone *Heteractis magnifica* with several serine proteases including inflammatory proteases was investigated using surface plasmon resonance approach. We showed that recombinant analog of HMIQ3c1 makes strong enough complexes with trypsin ($K_D = 1,07 \cdot 10^{-9}$ M) and chymotrypsin ($K_D = 4,70 \cdot 10^{-8}$ M). Analysis of thermodynamic parameters of HMIQ3c1/chymotrypsin revealed significant contribution of entropic factor in complex formation. The formation of specific complexes of HMIQ3c1 with neutrophil elastase ($K_D = 1,11 \cdot 10^{-7}$ M) and kallikrein ($K_D = 2,81 \cdot 10^{-8}$ M) indicates its anti-inflammatory activity and makes prospects to use the peptide as a potential therapeutic agent.

Keywords: sea anemone, Kunitz-type peptide, serine proteases, *Heteractis magnifica*.