
БИОЛОГИЯ

УДК: 577.1

Осмаков Д.И., Андреев Я.А., Козлов С.А.**ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ МОРСКИХ АНЕМОН***

Аннотация. В работе приведена методика получения и очистки рекомбинантных полипептидов, представляющих практический интерес. Это несколько небольших полипептидных компонентов яда морских анемонов, обладающих обезболивающим действием: APETx2, селективно блокирующий протон-чувствительные каналы ASIC3; и три гомологичных полипептида APHC1, APHC2 и APHC3, модулирующих активность ваниллоидного рецептора TRPV1. Первоначально были получены конструкции для бактериального синтеза полипептидов в составе слитных белков с фрагментом тиоредоксина, и далее осуществлена наработка и очистка полипептидов по общей схеме выделения. Биологическая активность полученных в работе рекомбинантных продуктов соответствовала активности, ранее измеренной для природных полипептидов.

Ключевые слова: полипептидные токсины, рекомбинантные аналоги, экспрессионные конструкторы.

D. Osmakov., Y. Andreev., S. Kozlov

SEA ANEMONE BIOLOGICAL ACTIVE RECOMBINANT POLYPEPTIDES PRODUCTION

Abstract. A procedure for production of practically important recombinant polypeptides is presented in this paper. Those are recombinant analogues of sea anemone venom components with anesthetic effect: APETx2 selectively blocking acid-sensing ion channels ASIC3, and three homologous peptides APHC1, APHC2 and APHC3, that modulate activity of vanilloid receptor TRPV1. Polypeptides were purified using unified procedure from fusion proteins containing thioredoxin fragment after expressing plasmids had been constructed. The biological activity of recombinant polypeptides obtained in this work was equal to the activity measured for natural polypeptides.

Key words: polypeptide toxins, recombinant analogues, expression constructs.

Морские анемоны - одни из древнейших известных хищных животных на Земле. Они охотятся на мелких рыб, ракообразных и моллюсков, обездвиживая их при помощи стрекательных клеток, расположенных на щупальцах вокруг ротового отверстия. Стрекательные клетки анемонов при воздействии на человека могут вызывать зуд и жжение в месте контакта, в редких случаях возможно образование некрозов тканей, в еще более редких случаях может развиться лихорадка, возникнуть головная боль и слабость. Негативное влияние на человека связано, главным образом, с действием многочисленных цитотоксических компонентов ядов анемонов на мембраны клеток млекопитающих [13].

Общепринятое название таких цитолитических компонентов анемонов – цитолизины, представляющих собой неоднородную группу мембраноактивных молекул [8]. Полипептидные цитолизины молекулярной массы 5-8 кДа – представители первой группы, про-

* © Осмаков Д.И., Андреев Я.А., Козлов С.А.

являющие порообразующую и антигистаминную активности [3, 18], ко второй группе относятся многочисленные актинопорины – белки около 20 кДа, формирующие поры в клеточных мембранах [4, 9], в третью группу (белки 30 – 40 кДа) входят пороформирующие белки и фосфолипазы А2 [14, 19]. Представителем последней группы является холестерин ингибирующий цитолизин – метридиолизин с молекулярной массой около 80 кДа [6].

Помимо мембранолитических компонентов, в ядах анемон было обнаружено большое количество полипептидов с разнообразной биологической активностью. Прежде всего это нейротоксины, способные при низких концентрациях вызывать паралич потенциальных жертв путем ингибирования работы ионных каналов [12].

Кроме парализующих компонентов, анемоны способны продуцировать нетоксичные полипептидные молекулы. Наиболее яркий пример – это найденные в яде различных видов анемон ингибиторы протеолитических ферментов [2, 7, 11]. При этом как токсические компоненты яда, так и пептидные ингибиторы протеаз имеют одинаковую пространственную укладку, а некоторые компоненты из яда анемон имеют ингибирующую активность и на ионные каналы, и на сериновые протеазы [20, 22].

Помимо нейтральных и токсичных компонентов, анемоны продуцируют полипептидные компоненты с обезболивающим действием, активно изучаемые в нашей лаборатории. На сегодня опубликованы данные о наблюдаемом эффекте обезболивания на животных моделях при инъекциях таких полипептидных токсинов, как: АРЕТх2 (селективного блокатора протон-чувствительных каналов ASIC3) [15], АРНС1, АРНС2, АРНС3 (модуляторов активности ваниллоидного рецептора TRPV1) [1, 5].

Поскольку выделение активных полипептидов из природных источников сопряжено с различными сложностями, в настоящей работе была разработана схема получения рекомбинантных аналогов полипептидов с обезболивающим действием: АРНС1-3 и АРЕТх2. И была проведена наработка этих продуктов для изучения их биологической активности в различных экспериментальных условиях.

Материалы и методы. Фрагменты генов, кодирующих зрелые пептиды, получали с помощью ПЦР из праймеров, подобранных с учетом оптимизации использования кодонов для *E. coli*. Продукт амплификации обрабатывали рестриктазами EcoR1/XhoI, очищали с помощью гель-электрофореза и лигировали с плазмидой рЕТ32b, расщепленной теми же рестриктазами. В качестве белка-партнера брали фрагмент тиоредоксина, обеспечивающий более высокий выход и правильность замыкания дисульфидных связей у цистеин-содержащих белков.

Аминокислотные последовательности анальгетических пептидов не содержат аминокислотного остатка метионина (Met), поэтому использовали его для расщепления слитного белка методом гидролиза пептидной связи бромцианом. Остаток Met был добавлен перед первым аминокислотным остатком полипептидов, сразу после последовательности фрагмента тиоредоксина. Лигаты трансформировали в клетки штамма XL1-Blue. Полученные клоны анализировали с помощью ПЦР «на колониях» и секвенировали. Полученными экспрессирующими конструкциями электротрансформировали клетки штамма BL21(DE3). Которые затем выращивали в 200 мл среды LB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл), при 37°C с интенсивной аэрацией до достижения OD_{600} 0,6-0,8 (6-8 часов), после чего экспрессию белков индуцировали добавлением изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до концентрации 0,2-0,4 мМ и инкубировали 12-16 часов.

Бактериальные клетки осаждали центрифугированием при 4°C, 5000 об/мин в течение 15 мин. Осадок клеток ресуспендировали в 20 мл стартового буфера для аффинной хроматографии (20 мМ Трис-НСl рН 7,5, 500 мМ NaCl), помещали в лед и подвергали уль-

тразвуковой дезинтеграции. Клеточный лизат осветляли центрифугированием при 15000 об/мин в течение 20 мин (4°C). Лизат наносили на колонку с Co^{2+} -сефарозой (Clonetech), уравновешенную стартовым буфером. После нанесения колонку промывали 5 объемами стартового буфера. Слитные белки элюировали буфером, содержащим 20 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 500 мМ NaCl, 150 мМ имидазол. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по расчетному значению коэффициента молярной экстинкции. Затем к раствору белка добавляли концентрированную соляную кислоту до конечной концентрации 0.5 М и 600-кратный молярный избыток BtCN над белком.

Реакцию гидролиза целевого продукта из состава слитного белка проводили при комнатной температуре в темноте 14-16 часов. Реакционную смесь упаривали досуха, растворяли в 0,1% растворе трифторуксусной кислоты (ТФУ) и наносили на обращенно-фазную колонку Jupiter C4 (Phenomenex), где получали очищенные соединения. Выход фракций определяли спектрофотометрически по поглощению при длинах волн 214 и 280 нм.

Константы ингибирования для трипсина и α -химотрипсина определяли методом Диксона [17] с использованием в качестве субстратов BAPNA и BTEE.

Для проведения теста горячей пластины пептиды вводили внутривенно, в хвостовую вену. Через 15 мин. мышь помещали на разогретую до 55°C металлическую пластину. Регистрировали время с момента посадки до первого облизывания задней лапы и до первого подпрыгивания.

Результаты и обсуждение.

Все исследуемые полипептиды содержат в своей структуре по 3 дисульфидных связи. Поэтому для экспрессии была выбрана плаزمид рЕТ-32b, которая дает возможность экспрессировать полипептиды в виде слитного белка с фрагментом тиоредоксина. Являясь хорошо растворимым белком, фрагмент тиоредоксина способствует замыканию дисульфидных связей и обеспечивает высокое содержание слитного белка в растворе [21]. Это, с одной стороны, не позволяет получить большого выхода целевого продукта, как в случае наработки белков в составе телец включения, но позволяет исключить дополнительную стадию ренатурации полипептидов в активную форму. Выход целевых полипептидов, после заключительной стадии очистки ВЭЖХ, с литра культуры клеток *E. coli* отличался для каждого из нарабатываемых полипептидов. Значительный выход рекомбинантного полипептида для экспрессии в водорастворимой форме показали два белка АРНС2 и АРНС3 по 8,2 мг, средний выход получили для АРНС1 - 3,3 мг, и низкий выход получили для АРЕТх2 - 0,5мг. Таким образом, несмотря на присутствие тиоредоксина в качестве белка-партнера, не во всех случаях удается добиться высокого выхода целевого продукта.

Биологическая активность полученных рекомбинантных полипептидов соответствовала описанной в литературе для природных белков. Все три рекомбинантных полипептида АРНС1-3 обладали способностью ингибировать трипсин (измеренное $K_i=1*10^{-6}$, $0,9*10^{-6}$, $5*10^{-7}$ соответственно) и хемотрипсин (измеренное $K_i=5*10^{-6}$, $4,5*10^{-6}$, $7*10^{-6}$ соответственно) на уровне, близком к значениям, опубликованным для АРНС1 [10], и анальгетической активностью в тесте горячей пластины, сопоставимой с данными для АРНС1 [1]. Активность рекомбинантного АРЕТх2 в тестах на экспрессированных в ооцитах *Xenopus laevis* каналах hASIC3 (рецептор человека) полностью соответствовала опубликованным в литературе данным: токсин вызывал обратимую блокаду пиковой компоненты ионных токов через hASIC3 каналы и не изменял проводимость стационарной компоненты, измеренная половинная ингибирующая концентрация IC_{50} составила 205 нМ, что немногим отличалось от значения IC_{50} 65нМ, описанного для каналов rASIC3 (рецептор крысы) [16].

Предлагаемая схема получения рекомбинантных полипептидов, модулирующих разные звенья восприятия болевых и воспалительных стимулов, может внести ценный вклад в решение ряда фундаментальных проблем, таких, как изучение молекулярных основ функционирования ноцицептивной системы и влияние активности рецепторов TRPV1 и ASIC3 на развитие ряда патологических процессов в организме.

Низкий выход АРЕТх2, по-видимому, связан с неправильным сворачиванием полипептида в условиях гетерологической экспрессии и его выпадением в клеточный осадок. Количество такого белка в осадке не анализировали, так как дальнейшая работа с неправильно собранным белком нецелесообразна. Вместо этого для увеличения выхода АРЕТх2 в дальнейшем планируется изменить условия индукции экспрессии и оптимизировать температурные режимы роста клеток.

Работа была поддержана программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и средствами Федерального агентства по науке и инновациям по государственному контракту № 02.512.11.2283 от 10 марта 2009 г

ЛИТЕРАТУРА:

1. Андреев Я.А., Козлов С.А., Козловская Э.П., Гришин Е.В. () Анальгетическое действие пептидного ингибитора TRPV1-рецептора в моделях тепловой стимуляции боли // Доклады Академии наук. 2009. №424, 688-691.
2. Зыкова Т.А., Винокуров Л.М., Маркова Л.Ф., Козловская Э.П., Еляков Г.Б. Аминокислотная последовательность трипсинового ингибитора IV из *Radianthus macrodactylus* // Биоорган. Химия. 1985. №11, 293-301.
3. Зыкова Т.А., Монастырская М.М., Апаликова О.В., Швецов Т.В., Козловская Э.П. Низкомолекулярные цитолитины и ингибиторы трипсина из морской актинии *Radianthus macrodactylus*. Выделение и частичная характеристика // Биоорган. Химия. 1997. №54, 509-516.
4. Ильина А.П., Монастырская М.М., Исаева М.П., Гузев К.В., Рассказов В.А., Козловская Э.П. Первичная структура актинопорина актинии *Oulactis orientalis* // Биоорган. Химия. 2005. №31, 357-362.
5. Козлов, С.А., Андреев, Я.А., Мурашев, А.Н., Скобцов, Д.И., Дьяченко И.А., Гришин Е.В. Новые полипептидные компоненты с анальгетической активностью из морской анемоны *Heteractis crispa* // Биоорганическая химия. 2009. №35, 789-798.
6. Монастырская М.М., Козловская Э.П., Иванов А.С., Мольнар А.А., Халилов Э.М., Еляков, Г.Б. Действие метридиолизина из морской анемоны *Metridium senile* на биологические и модельные мембраны // Биол. Мембраны. 1988. №5, 830-835.
7. Сокотун И.Н., Лейченко Е.В., Вакорина Т.И., Еськов А.А., Ильина А.П., Монастырская М.М., Козловская Э.П. Ингибитор сериновых протеиназ из актинии *radianthus macrodactylus*: выделение и физико-химические свойства // Биоорган. Химия. 2007. №33, 448-455.
8. Anderluh, G. and Macek, P. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria) // Toxicon. 2002. №40, 111-124.
9. Anderluh, G., Pungercar, J., Strukelj, B., Macek, P. and Gubensek, F. Cloning, sequencing, and expression of equinatoxin II // Biochem Biophys Res Commun. 1996. №220, 437-442.
10. Andreev, Y. A., Kozlov, S. A., Koshelev, S. G., Ivanova, E. A., Monastyrnaya, M. M., Kozlovskaya, E. P. and Grishin, E. V. Analgesic compound from sea anemone *Heteractis crispa* is the first polypeptide inhibitor of vanilloid receptor 1 (TRPV1) // J Biol Chem. 2008. №283, 23914-23921.
11. Antuch, W., Berndt, K. D., Chavez, M. A., Delfin, J. and Wuthrich, K. The NMR solution structure of a Kunitz-type proteinase inhibitor from the sea anemone *Stichodactyla helianthus* // Eur J Biochem. 1993. №212, 675-684.
12. Bosmans, F. and Tytgat, J. Sea anemone venom as a source of insecticidal peptides acting on voltage-gated Na⁺ channels // Toxicon. 2007. №49, 550-560.
13. Carli, A., Bussotti, S., Mariottini, G. L. and Robbiano, L. Toxicity of jellyfish and sea-anemone venoms on cultured V79 cells // Toxicon. 1996. №34, 496-500.
14. Cline, E. I., Wiebe, L. I., Young, J. D. and Samuel, J. Toxic effects of the novel protein UpI from the sea anemone *Urticina piscivora* // Pharmacol Res. 1995. №32, 309-314.
15. Deval, E., Noel, J., Lay, N., Alloui, A., Diochot, S., Friend, V., Jodar, M., Lazdunski, M. and Lingueglia, E. ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain // Embo J. 2008. №27, 3047-3055.

16. Diochot, S., Baron, A., Rash, L. D., Deval, E., Escoubas, P., Scarzello, S., Salinas, M. and Lazdunski, M. A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons // *Embo J.* 2004. №23, 1516-1525.
17. Dixon, M. The determination of enzyme inhibitor constants // *Biochem J.* 1953. №55, 170-171.
18. Elliott, R. C., Konya, R. S. and Vickneshwara, K. The isolation of a toxin from the dahlia sea anemone, *Tealia felina* L // *Toxicon.* 1986. №24, 117-122.
19. Grotendorst, G. R. and Hessinger, D. A. Purification and partial characterization of the phospholipase A2 and co-lytic factor from sea anemone (*Aiptasia pallida*) nematocyst venom // *Toxicon.* 1999. №37, 1779-1796.
20. Honma, T., Kawahata, S., Ishida, M., Nagai, H., Nagashima, Y. and Shiomi, K. Novel peptide toxins from the sea anemone *Stichodactyla haddoni* // *Peptides.* 2008. №29, 536-544.
21. LaVallie, E. R., DiBlasio, E. A., Kovacic, S., Grant, K. L., Schendel, P. F. and McCoy, J. M. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm // *Biotechnology (N Y).* 1993. №11, 187-193.
22. Schweitz, H., Bruhn, T., Guillemare, E., Moinier, D., Lancelin, J. M., Beress, L. and Lazdunski, M. Kaliclutidines and kaliseptine. Two different classes of sea anemone toxins for voltage sensitive K⁺ channels // *J Biol Chem.* 1995. №270, 25121-25126.