

**Учреждение Российской академии наук
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН**

На правах рукописи

Андреев Ярослав Алексеевич

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИРОДНЫХ МОДУЛЯТОРОВ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ
АКТИВНОСТИ TRPV1 РЕЦЕПТОРОВ**

**специальность – 03.00.03 – молекулярная биология
АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва-2009

Работа выполнена в лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов
Учреждения Российской академии наук Институт биоорганической химии им.
академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Научный руководитель:

доктор химических наук, чл.-корр. РАН Гришин Евгений Васильевич

Официальные оппоненты:

доктор химических наук
Уткин Юрий Николаевич

кандидат биологических наук
Дмитриев Сергей Евгеньевич

Ведущая организация:

Учреждение Российской академии наук
Институт молекулярной биологии
им. В. А. Энгельгардта РАН

Защита состоится 2009 г. в часов на заседании
диссертационного совета Д.002.019.01 при Учреждении российской академии
наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН по адресу: 117871, ГСП-7, Москва В-437, ул. Миклухо-
Маклая, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биоорганической
химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Автореферат разослан октября 2009 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор физико-математических наук



В.А. Олейников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Боль представляет собой важнейший физиологический феномен, который информирует организм о вредных воздействиях (повреждающих или представляющих потенциальную опасность). Таким образом, боль – это предупредительная и защитная система, непосредственно обеспечивающая выживание индивидуума. Однако патологическая боль представляет собой нежелательное явление, вызывающее страдания, резко снижающее качество жизни и работоспособность. В настоящее время одной из основных причин обращения людей за врачебной помощью являются болевые синдромы. По разным данным от 40 до 64 % взрослого населения развитых стран страдает от хронической боли. Несмотря на то, что на сегодняшний день в медицинской практике применяется много различных обезболивающих препаратов, все они либо недостаточно эффективны, либо обладают нежелательными побочными эффектами и имеют противопоказания к применению, что резко ограничивает область их клинического использования. Кроме того, некоторые типы болевых состояний, например, различные невропатии, практически нечувствительны к этим препаратам. Все это делает поиск новых обезболивающих агентов одной из важнейших задач современной медицины и фармакологии.

Ваниллоидный рецептор 1, также известный как TRPV1, является одним из важнейших интеграторов болевых и воспалительных стимулов, что позволяет рассматривать его как перспективную терапевтическую мишень в лечении болевых состояний. Считается, что, в отличие от традиционных анальгетических средств, которые подавляют либо воспалительные процессы, либо передачу болевых сигналов, антагонисты TRPV1 предотвращают боль, блокируя важный рецептор и интегратор болевых стимулов на чувствительных нейронах. Несмотря на то, что за последние годы изучено довольно много низкомолекулярных агонистов и антагонистов TRPV1 (некоторые из них уже

используются в клинической практике), до сих пор не было обнаружено пептидных молекул, проявляющих выраженную ингибиторную активность в отношении этого рецептора. Исключение составляют синтетические аргинин-богатые пептиды и малые пептидные молекулы, сходные с ними по структуре. Вместе с тем, ингибиторы TRPV1 пептидной природы могут иметь большое значение для разработки новых анальгетических средств. По сравнению с низкомолекулярными аналогами они могут оказывать более специфичное терапевтическое воздействие и вызывать меньшее количество системных побочных эффектов. Кроме того, на их основе открывается возможность оптимизации структуры и, следовательно, фармакологических свойств молекулы путем мутагенеза.

Цель и задачи работы

Целью данной работы был поиск и идентификация молекул пептидной природы, модулирующих функциональную активность TRPV1. Поиск проводили в ядах и экстрактах беспозвоночных, которые часто представляют собой комбинаторные библиотеки полипептидов с различными фармакологическими свойствами. Были поставлены следующие задачи:

1. Провести первичный электрофизиологический анализ ядов и экстрактов беспозвоночных на наличие молекул, модулирующих активность TRPV1.
2. Выделить и установить структуру индивидуальных компонентов, обладающих искомыми свойствами.
3. Установить структуру генов, кодирующих активные полипептиды.
4. Провести функциональную экспрессию модуляторов TRPV1.
5. Осуществить функциональную характеристику активных полипептидов.

Научная новизна работы и практическая значимость работы

Впервые обнаружены природные полипептидные молекулы, обладающие ингибирующей активностью в отношении TRPV1 рецептора. Установлена первичная структура трех новых полипептидов (APHC1-3).

Выявлена высокая анальгетическая активность обнаруженных полипептидов. Получена последовательность кДНК, кодирующая предшественник АРНС1.

Выявление анальгетических свойств полипептидных модуляторов TRPV1 рецептора имеет большую практическую ценность для создания лекарств нового поколения. Разработана лабораторная методика получения АРНС1-3 биотехнологическими методами, что позволяет надеяться на возможность масштабирования полученных результатов до уровня промышленного производства.

Помимо вероятной практической значимости, полученные результаты могут внести ценный вклад в решение ряда фундаментальных проблем, таких как изучение молекулярных основ функционирования рецептора TRPV1, поиск новых природных модуляторов активности каналов TRPV1, изучение влияния активности TRPV1 рецепторов на развитие ряда патологических процессов в организме.

Апробация работы

Основные материалы диссертации были представлены на следующих конференциях и симпозиумах:

1. III Российский симпозиум «Белки и пептиды», Пущино, 2007.
2. XX зимняя международная молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» Москва, 2008.
3. The European Section Meeting of the International Society on Toxinology. Leuven, Belgium, 2008.
4. Международная конференция «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга» Санкт-Петербург, 2008.
5. 12-ая международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пущино, 2008 г.

6. Международный конкурс научных работ молодых ученых в области нанотехнологий. Международный форум по нанотехнологиям. Rusnanotech08. 2008, Москва.

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ и получен один патент Российской Федерации.

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа изложена на _____ страницах, содержит _____ рисунков и _____ таблиц, имеет традиционную структуру и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы и список цитируемой литературы, включающий _____ источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Поиск модуляторов функциональной активности TRPV1.

Для идентификации соединений, оказывающих модулирующее действие на TRPV1 рецепторы, был использован электрофизиологический метод анализа токов в мембранах ооцитов лягушки *Xenopus laevis* с экспрессированным TRPV1. Регистрация ионных токов через TRPV1 каналы осуществлялась в условиях фиксации мембранного потенциала. Препараты ядов и экстрактов беспозвоночных тестировали в двух вариантах: с концентрацией белка в пробе 1 мг/мл или 0,1 мг/мл. Таким образом, было протестировано 20 ядов паукообразных и 3 экстракта морских беспозвоночных. Ряд ядов и экстрактов, содержащих значительное количество мембранно-активных компонентов, подвергали первоначальному разделению на фракции с последующим тестированием. Наиболее выраженная искомая активность была выявлена в одной из фракций спиртового экстракта нематоцистов *Heteractis crispa*.

Выделение и установление структуры APHC1

Идентифицированная фракция была подвергнута дальнейшему разделению, включавшему в себя две стадии ионообменной хроматографии и хроматографию на обращенной фазе (рис. 1). В результате получен полипептид с $M_r \sim 6187$ Да, который в тест-системе на ооцитах *X. laevis* с экспрессированным TRPV1 ингибировал ионные токи, индуцированные капсаицином. Выделенный полипептид был назван APHC1 (Analgesic Polypeptide Heteractis Crispa 1).

Для установления первичной структуры, APHC1 был восстановлен и алкилирован винилпиридином. Затем на автоматическом секвенаторе установлена N-концевая аминокислотная последовательность: GSICLEPKVVGPCTA. Используя эту информацию, удалось подобрать два вырожденных праймера Ing1 и Ing2. Для установления 3'-концевого фрагмента кДНК APHC1 использовали метод 3'-RACE.

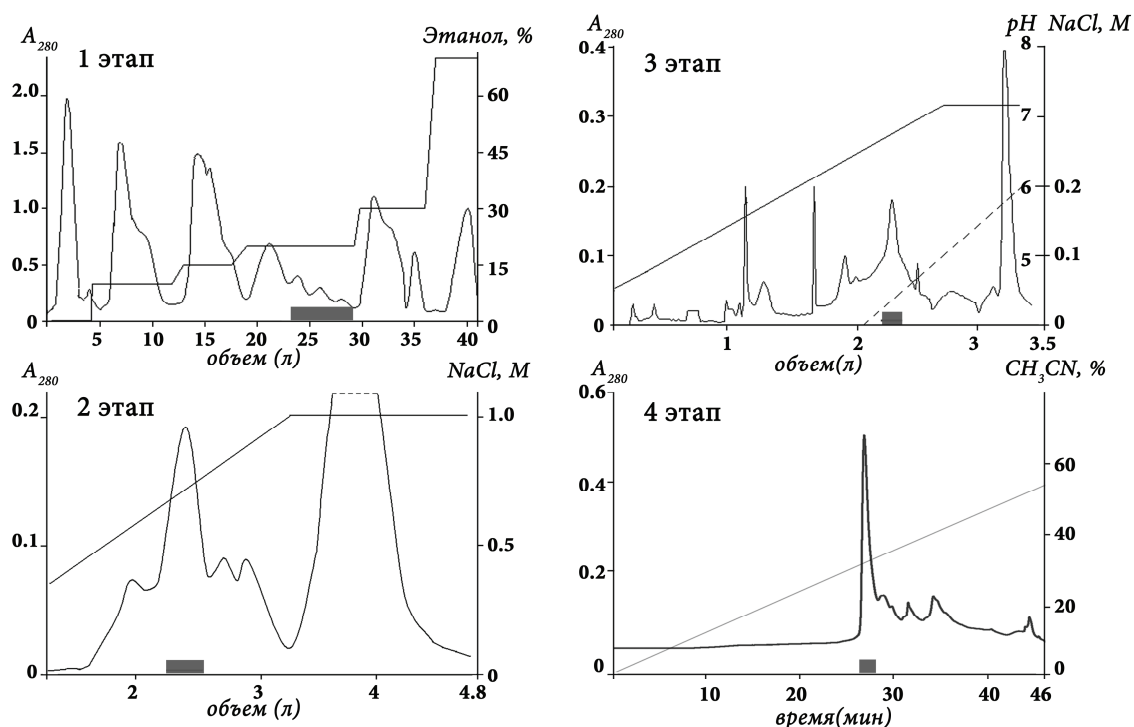


Рис. 1 Основные стадии хроматографического выделения анальгетического полипептида APHC1 из спиртового экстракта нематоцитов актинии *Heteractis crispa*. 1 этап. Первоначальное разделение спиртового экстракта на гидрофобной колонке с сорбентом Полихром-1 (7×30 см) в градиенте этанола (выделена область активной фракции) 2 этап. Хроматографическое разделение активной фракции I на ионообменной колонке Bio-Rex 70 (2,5×60 см) в градиенте концентрации NaCl, 5 mM аммоний-ацетатном буфере (pH 4,5). 3 этап. Хроматографическое разделение активной фракции II на ионообменной колонке SP-Sephadex C-25 (2,5×40 см) в градиенте NaCl, 5 mM аммоний-ацетатном буфере (pH 4,5). 4 этап. ВЭЖХ активного компонента на колонке Jupiter C₅ (4,6×150 мм) в градиенте ацетонитрила в буфере, содержащем 0,1% трифторуксусную кислоту.

Первую цепь кДНК получали на основе тотальной РНК нематоцитов *H. crispa* с помощью Т-праймера, содержащего d(T)₃₀ и 5'-концевую адаптерную последовательность. Первую цепь кДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР с вырожденными праймерами Ing1, Ing2 и универсальным праймером M1T7. Полученные фрагменты ДНК длиной около 350 н.п. были клонированы в плазмиду pBS-SK+. При секвенировании клонов выявлено значительное число последовательностей, отличающихся точечными заменами. Была выбрана последовательность, кодирующая полипептид с расчетной молекулярной массой 6187,07 Да и с идентичной ранее установленной N-концевой аминокислотной последовательностью. Для доказательства правильности выбранной структуры, пептидная цепь восстановленного и алкилированного винилпиридином APHC1

была расщеплена трипсином. Полученные пептиды подвергли MS/MS фрагментации. Пептидная карта и анализ спектров MS/MS фрагментации триптического гидролизата подтвердили правильность выведенной последовательности APHC1.

Для установления полной последовательности кДНК, кодирующей APHC1, использовали метод 5'-RACE. Первую цепь кДНК получали на основе тотальной РНК нематоцистов *H. crisp*a с использованием Т-праймера и PlugOligo-праймера. Далее первая цепь служила матрицей в ПЦР с геноспецифическим праймером Rev2ing и универсальным M1T7. Полученный ПЦР-фрагмент (~300 н.п.) клонировали в плазмиду pBS-SK+ и секвенировали. Таким образом была получена полная последовательность кДНК, кодирующая APHC1, и выведена аминокислотная последовательность предшественника APHC1. В его структуре находится сигнальный пептид длиной 22 аминокислотных остатка и зрелая цепь (56 аминокислотных остатков)(рис.2).

```

cDNA: gatcactttctccaaccacacagagagcaagacaagataacaagatgaagggaacttt
APHC1  ·I·T·F·S·N·H·N·R·E·Q·R·Q·D·N·K·M·K·G·T·F·

cDNA: tcttatttgtctgactcctaatygcaggtttctcttttcaaagcactcaagccggttagcat
APHC1  ·L·I·C·L·I·L·I·A·G·F·S·F·K·S·T·Q·A·G·S·I·

cDNA: ttgtttagaacccaaagtagttggcccggtgtaccgcgtattttcgaagattctacttcga
APHC1  ·C·L·E·P·K·V·V·G·P·C·T·A·Y·F·R·R·F·Y·F·D·

cDNA: ttcagagactggaaagtgcacagtgttcacatctacggtggatgaggggaaatggaaataa
APHC1  ·S·E·T·G·K·C·T·V·F·I·Y·G·G·C·E·G·N·G·N·N·

cDNA: ctttgagaccctgcgtgcatgccgagctatatgcagggcgtaatcttggttagaagagcaa
APHC1  ·F·E·T·L·R·A·C·R·A·I·C·R·A·*·

cDNA: tgagaagttccaaattgctacaaaaagtcaagtaaagataaaaaataaaagatgtaaatc
cDNA: attaacgtggatttagtaattgtatttaagtgaataatgggaataaaaggatgscaatccac
cDNA: taaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

Рис. 2 Нуклеотидная последовательность и выведенная из нее аминокислотная последовательность белка-предшественника APHC1. Сигнальный пептид выделен серым и подчеркиванием, стрелкой отмечено место его отщепления.

В клонированных кДНК *H. crisp*a обнаружена последовательность одного из хорошо представленных в экстракте нематоцистов пептидов с массой

6107 Да. Структура пептида HC6107, выведенная из последовательности кДНК, была подтверждена N-концевым секвенированием и MS/MS фрагментацией. Он является очень близким структурным гомологом APHC1, но по результатам электрофизиологических экспериментов не влияет на функционирование TRPV1. Сравнительный анализ их первичных структур позволил выявить аминокислотные остатки, потенциально важные для ингибирования TRPV1.

Гомологи APHC1, модулирующие активность TRPV1

При анализе последовательностей кДНК и геномной ДНК *H. crispa*, кодирующих гомологи APHC1, был обнаружен клон, соответствующий полипептиду с Mr~6185Да (APHC2), аминокислотная последовательность которого отличалась от APHC1 одной заменой Val31 на Pro31. APHC2 также детектировался во фракциях экстракта нематоцистов *H. crispa* и его структура подтверждена MS/MS фрагментацией. Полипептид APHC2 обладал слабо детектируемой (10-15%) ингибирующей активностью на токи, вызываемые капсаицином в ооцитах с экспрессированным TRPV1 в концентрациях от 100 нМ до 3 мкМ.

Более детальное электрофизиологическое тестирование фракций яда *H. crispa* выявило еще один полипептид с Mr~6111Да (APHC3), обладающий ингибирующей активностью (~30%) токов, индуцируемых капсаицином. Структура APHC3 определена секвенированием по Эдману, после предварительного восстановления дисульфидных связей и алкилирования винилпипридином.

Анализ первичной структуры APHC1.

APHC1 – это полипептид из 56 аминокислотных остатков, содержащий 6 остатков цистеина. Анализ первичной структуры APHC1 выявил высокий уровень гомологии с ингибиторами трипсина семейства BPTI/Kunitz из морских анемонов: около 85% идентичных аминокислотных остатков с ингибитором трипсина IV (Uniprot ID P16344) из *H. crispa* и примерно 81% идентичности аминокислотных остатков с SHPI-1 из *Stichodactyla helianthus* (Uniprot ID

P31713). APHC1 имеет характерный тип укладки полипептидной цепи, обладающей дисульфид-богатой α/β структурой типа BPTI/Kunitz, впервые описанной для ингибитора сериновых протеаз из поджелудочной железы быка (BPTI, Bovine Pancreas Trypsin Inhibitor). Основные черты структурного семейства BPTI/Kunitz: длина 50-60 аминокислотных остатков, 6 остатков цистеина (3 дисульфидных связи), глицин в положении -2 ко второму цистеину, триплет ароматических аминокислот в центре молекулы и типичное расположение нескольких ароматических, глициновых и аспарагиновых остатков около 4-го цистеина.

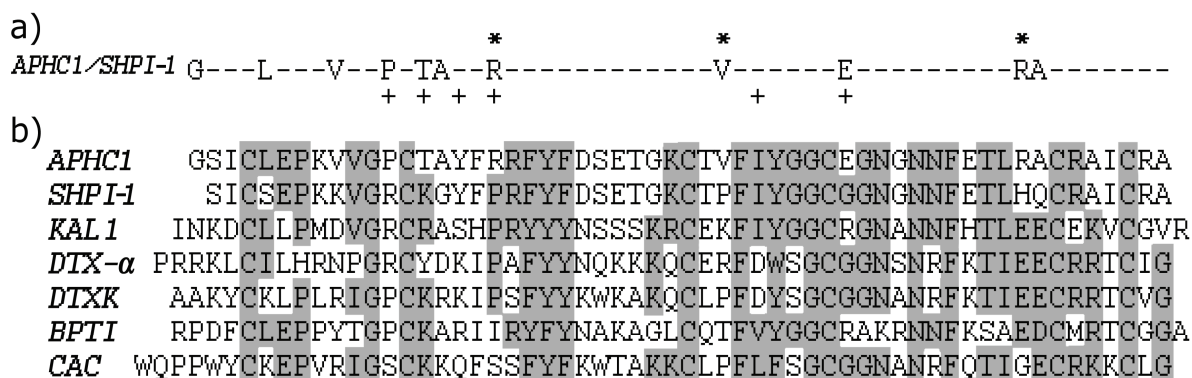


Рис. 3 Сравнение аминокислотной последовательности APHC1 с последовательностями полипептидов BPTI/Kunitz типа. А. Диаграмма отличающихся аминокислотных остатков в APHC1 и ингибиторе трипсина SHPI-1 из морской анемоны *S. helianthus*, знаком (+) помечены позиции остатков, участвующих в ингибировании сериновых протеаз, аргинины и валин, которые потенциально важны для активности APHC1 отмечены (*). Б. Аминокислотные последовательности APHC1, SHPI-1 (ингибитор сериновых протеаз из морской анемоны *S. helianthus*, KAL1 (каликлюдин 1 – ингибитор K^+ каналов и трипсина из морской анемоны *Anemona sulcata*), дендротоксины змей: DTX α (*Dendroapsis angusiceps*) и DTXK (*Dendroapsis polylepis* - блокаторы K^+ каналов), BPTI, кальциклидин (CAC) - блокатор высокопороговых Ca^{2+} каналов из *D. angusiceps*. Одинаковые или похожие остатки выделены серым.

Следует отметить, что приведенные структурные особенности обеспечивают пространственную укладку полипептидной цепи в эллипсоидную глобулу, но не определяют биологические свойства полипептида. Поэтому существует множество молекул с подобным типом укладки полипептидной цепи и с различными биологическими свойствами (рис.3). Наиболее известные полипептиды BPTI/Kunitz типа: ингибитор

сериновых протеаз BPTI, блокаторы калиевых и кальциевых каналов из яда змей семейства *Dendroapsis* (DTXK, DTX-1, DTX-α, кальциклидин).

Получение рекомбинантного APHC1.

Поскольку природный полипептид не доступен в препаративном количестве, для его детальной характеристики разработан метод получения рекомбинантного APHC1. Синтетическую нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующий полипептид, клонировали в вектор pET32b+ (рис.4), затем полученной конструкцией трансформировали штамм *E.coli* BL21(DE3), и индуцировали экспрессию добавлением ИПТГ. В качестве белка-партнера был выбран тиоредоксин, который обеспечивает более высокий выход и правильное замыкание дисульфидных связей у цистеин-богатых белков.

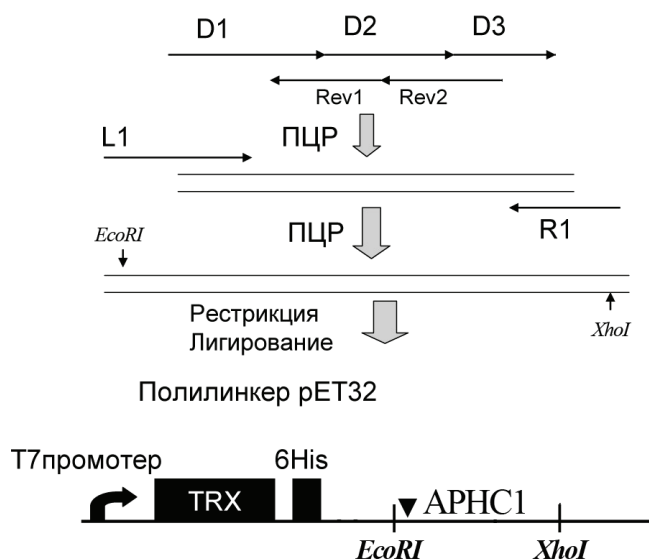


Рис. 4 Схема получения и клонирования синтетического гена APHC1. Место вставки аминокислотного остатка Met для последующего расщепления бромцианом отмечено черным треугольником, черные прямоугольники обозначают домен тиоредоксина и последовательность 6 гистидинов для металло-аффинной хроматографии.

Гибридный белок тиоредоксин-APHC1 выделяли при помощи металлоаффинной хроматографии на Co^{2+} сорбенте Talon™Superflow™, расщепляли BrCN в 0,1 М HCl по остатку метионина, введенному при создании экспрессионной конструкции. Целевой пептид APHC1 выделяли из гидролизной смеси с помощью ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой.

Нативный и рекомбинантный APHC1 идентичны по своим физико-химическим характеристикам и не различимы при совместной хроматографии

на обращенной фазе. Выход целевого полипептида АРНС1 с 1 литра культуры клеток *E. coli* составлял 3,3 мг. Биологическая активность рекомбинантного АРНС1 полностью соответствовала активности нативного полипептида.

Аналогично АРНС1 были получены рекомбинантные аналоги АРНС2 и АРНС3. Выход целевых полипептидов АРНС2-3 с 1 литра культуры клеток *E. coli* составлял ~8 мг. Более низкий выход АРНС1 можно объяснить заменой пролина на валин в положении 31, что, по-видимому, приводит к менее эффективному сворачиванию полипептида в условиях гетерологической экспрессии.

Ингибирование активности сериновых протеаз.

АРНС1 оказался очень слабым ингибитором сериновых протеаз (табл.1). Только его 8-кратный молярный избыток по отношению к трипсину приводил к практически полному ингибированию высвобождения паранитроанилина из субстрата BAPNA. Такой же избыток АРНС1 ингибировал активность химотрипсина только на 50%. В то время как ВРТИ (апротинин) полностью блокирует трипсин/химотрипсин при молярном соотношении 1:1.

АРНС2-3, также как и АРНС1, являются слабыми ингибиторами сериновых протеаз. Константы ингибирования (K_i) трипсина и химотрипсина АРНС2 практически полностью совпадают с соответствующими K_i АРНС1. АРНС3 немного лучше ингибирует трипсин и менее эффективно химотрипсин (табл. 1).

Таблица. 1. Константы ингибирования сериновых протеаз.

| полипептид | K_i трипсин | K_i химотрипсин |
|------------|---------------------|----------------------|
| АРНС1 | $1 \cdot 10^{-6}$ | $5 \cdot 10^{-6}$ |
| АРНС2 | $0,9 \cdot 10^{-6}$ | $4,5 \cdot 10^{-6}$ |
| АРНС3 | $5 \cdot 10^{-7}$ | $7 \cdot 10^{-6}$ |
| ВРТИ | $6 \cdot 10^{-14}$ | $1,8 \cdot 10^{-13}$ |
| SHPI-1 | $1 \cdot 10^{-10}$ | $2,3 \cdot 10^{-9}$ |

Электрофизиологические исследования АРНС1

Для измерения проводимости каналов TRPV1 в ооцитах использовалась двухэлектродная система фиксации мембранного потенциала при -50 мВ, сигналы регистрировались с частотой 100 Гц. Лиганд-активируемые токи вызывались кратковременной (20-40 сек) инкубацией ооцита в растворе, содержащем 2 мкМ капсаицина. Для испытаний использовались ооциты, показавшие стабильный ответ (3 и более раза) в диапазоне амплитуды суммарного тока 200-1000 нА. Контрольным значением тока принималась усредненная по нескольким измерениям проводимость канала TRPV1 после воздействия 2 мкМ капсаицина.

Совместная аппликация капсаицина и рекомбинантного АРНС1 проводилась с несколькими концентрациями исследуемого пептида (10 нМ – 3 мкМ) в пяти повторах для каждой концентрации. Концентрационная зависимость действия АРНС1 показывает, что действие пептида даже в насыщающих концентрациях не вызывает полной блокады TRPV1 каналов. Скорость восстановления ответа после отмывки пептида достаточно высокая, а само его действие полностью обратимо. На основании полученной зависимости "доза-ответ" (рис.5) была рассчитана величина половинного ингибирования индуцированных токов - EC_{50} , которая достигалась при 54 ± 4 нМ АРНС1, при расчетном значении коэффициента Хилла $2,12 \pm 0,19$, максимальное ингибирование составляло в среднем $32 \pm 9\%$ (наибольшее наблюдавшееся значение около 50%).

Исследуемый полипептид не оказывал никакого влияния на мембранный потенциал ооцитов с экспрессированным TRPV1. Преинкубация ооцита с АРНС1 перед аппликацией капсаицина не изменяла показателей ингибирования.

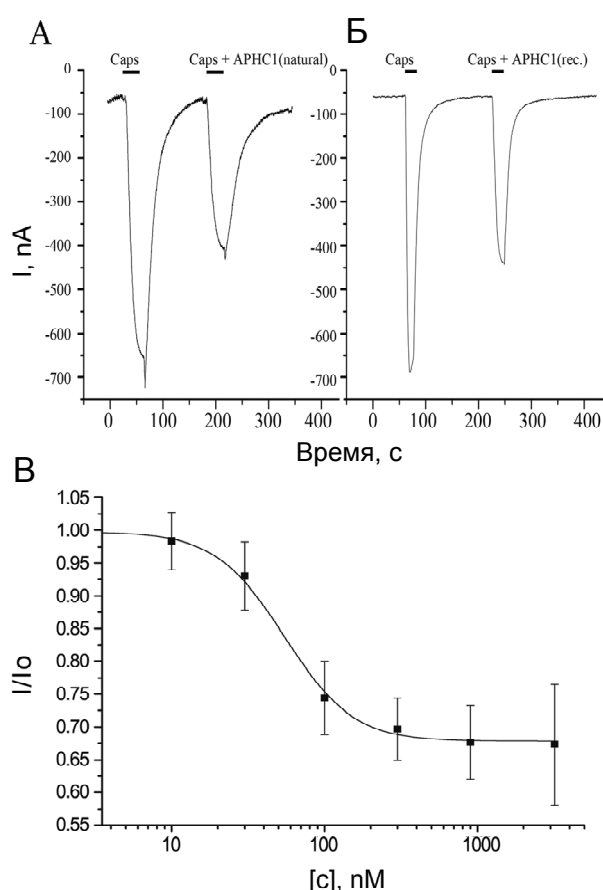


Рис. 5 Действие АРНС1 на капсаицин-индуцируемые каналы TRPV1. **А, Б** – записи проводимости каналов после добавления 2 мкМ капсаицина (Caps) и 2 мкМ капсаицина совместно с нативным АРНС1 (natural) (конечная концентрация 500 нМ) (**А**) или (**Б**) рекомбинантным АРНС1(rec.) (конечная концентрация 300нМ). **В** - кривая зависимости "доза-ответ", построенная как отношение тока после совместной аппликации АРНС1 с капсаицином к уровню тока возбуждения контрольного эксперимента.

АРНС1 имеет выраженную структурную гомологию с ингибиторами сериновых протеаз и ингибирует трипсин и химотрипсин. Поэтому для проверки возможности опосредованного влияния АРНС1 на TRPV1 через протеаз-активируемые системы анализировали действие ВРТИ на капсаицин-индуцированные токи. Совместная аппликация капсаицина и ВРТИ в концентрациях от 100нМ до 3мкМ не выявила никакого эффекта ВРТИ на токи, индуцированные капсаицином в ооцитах с экспрессированным TRPV1. Таким образом, можно сделать вывод, что АРНС1 напрямую взаимодействует с TRPV1 и является модулятором его активности.

Анальгетическая активность АРНС1 в моделях болевой чувствительности *in vivo*

Антагонисты TRPV1, по-видимому, могут облегчать боль при ряде патологических состояний организма. Исследование низкомолекулярных ингибиторов TRPV1 подтверждает, что фармакологическая блокада этого

рецептора может быть использована в терапии болей, возникающих при воспалении, раке и нейропатии.

Рекомбинантный АРНС1 не оказывал никаких токсических эффектов на мышцах в дозах до 1мг/кг. Введение АРНС1 не нарушало нормального поведения животных по данным оптомоторного теста.

Анальгетическая активность полипептида АРНС1 была проверена в тестах: отдергивания хвоста, горячей пластины, введения капсаицина и модели тепловой гиперчувствительности, вызванной CFA.

Для определения анальгетического эффекта АРНС1 в моделях тепловой стимуляции боли использовали тест горячей пластины и тест отдергивания хвоста. Эти тесты оценки болевой чувствительности основаны на активации TRPV1 и, возможно, некоторых других рецепторов. Известно, что именно в этих тестах мыши, дефектные по гену TRPV1, показывали существенные различия с мышами дикого типа. Предварительные данные по исследованию анальгетического воздействия в тесте отдергивания хвоста при внутримышечном введении АРНС1 показали, что статистически достоверное действие полипептида развивается не ранее чем через час. Поэтому была проведена серия экспериментов по анализу кинетики развития анальгетического эффекта в течение 5 часов (рис.6).

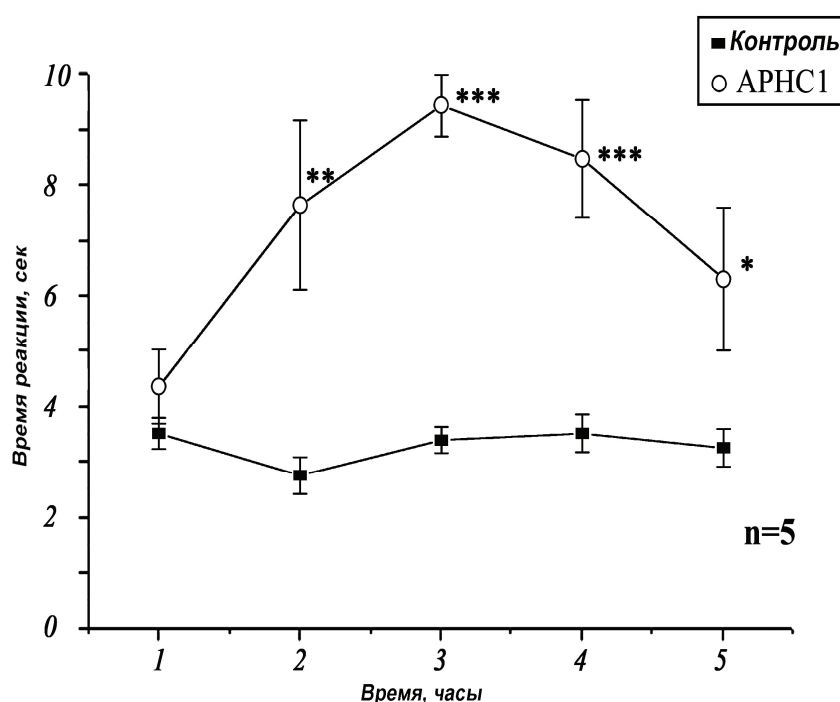


Рис. 6 Тест отдергивания хвоста. Рекомбинантный АРНС1 растворяли в стерильном растворе 0.9 % NaCl и вводили мышам внутримышечно в основание хвоста в дозе 0,1 мг/кг. Контрольные животные получали эквивалентный объем (100 мкл) стерильного физиологического раствора. Достоверность отличий от контроля определяли анализом вариабельности ANOVA и тестом Тьюки. Статистически достоверные различия отмечены *-p<0,06, ** - p<0,01, *** - p<0,005

Статистически достоверный анальгетический эффект полипептида оказался достаточно продолжительным (около 2 ч), что подразумевает высокую стабильность АРНС1 в организме, которая может быть объяснена устойчивостью к протеолизу из-за структурной гомологии с ингибиторами сериновых протеаз. Медленное развитие эффекта при внутримышечном введении, по-видимому, связано с низкой скоростью диффузии АРНС1 в организме. Для получения быстрого эффекта во всех остальных экспериментах использовали внутривенное введение полипептида.

При помещении мышей на горячую пластину с температурой 50-55⁰ С обычно происходит две последовательных поведенческих реакции - облизывание задних лап и подпрыгивание. Обе эти реакции супраспинальные (т.е. корректируются головным мозгом). Увеличение латентного времени этих реакций свидетельствует об анальгетическом эффекте анализируемого вещества. Однако, если на латентное время облизывания задних лап действуют в основном сильные анальгетики (например, морфин), то на латентное время подпрыгивания оказывают влияние и слабые анальгетики, такие как ацетилсалициловая кислота или парацетамол. Следует отметить, что действие слабых анальгетиков отмечается только в очень высоких дозах, а эффективные дозы опиоидов значительно выше, чем используется в клинике.

Была выявлена достоверная анальгетическая активность АРНС1 в тесте горячей пластины. Анализ минимальной действующей дозы полипептида показал, что АРНС1 обладает большим анальгетическим потенциалом – полипептид вызывал достоверно значимое увеличение латентного времени облизывания задних лап даже в дозе 0,01 мг/кг, а латентного времени подпрыгивания в дозе 0,025мг/кг. Следует отметить, что доза морфина необходимая для достижения аналогичного эффекта в тестах отдергивания хвоста и нагретой пластины составляет 1-2 мг/кг (при терапевтической дозе морфина для человека 0,3мг/кг).

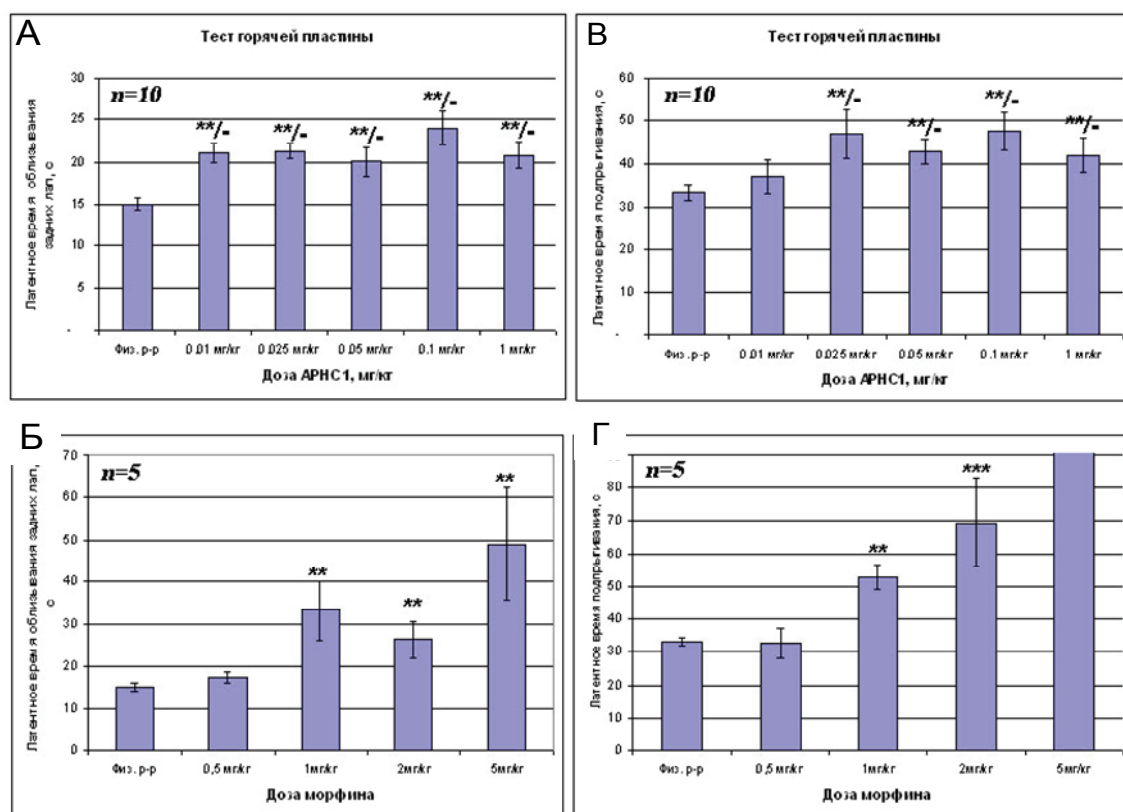


Рис. 7 Тест горячей пластины, $T=55^{\circ}\text{C}$. АРНС1 вводили внутривенно. Тестирование проводили через 15 мин после введения. **А, Б** Влияние различных доз АРНС1 (А) и морфина (Б) на латентное время облизывания задних лап. **В, Г** Влияние АРНС1 (В) и морфина (Г) на латентное время подпрыгивания. Достоверность отличий от контроля определяли анализом вариабельности ANOVA и тестом Тьюки. Статистически достоверные различия отмечены *- $p<0,05$, ** - $p<0,01$, *** - $p<0,005$, отсутствие достоверных различий эффектов с дозой АРНС1 0,1 мг/кг отмечено (-)

Несмотря на то, что на сегодняшний день известно значительное число низкомолекулярных антагонистов TRPV1, только некоторые из них способны оказывать анальгетический эффект в тесте отдергивания хвоста (IBTU) и/или в тесте горячей пластины (DD161515, DD191515). При этом низкомолекулярные антагонисты оказывают эффект в достаточно высоких дозах. Так, IBTU вызывает значимое увеличение латентного времени отдергивания хвоста только в дозах 30-60 мг/кг, а DD161515 и DD191515 в дозе 0,2 мМ/кг.

Специфичность действия АРНС на TRPV1 проверяли в капсаициновом тесте. Капсаицин является специфичным агонистом TRPV1. Введение его мышам в подушечку лапы вызывает характерное поведение, ассоциированное с

болью: мыши лижут лапу, проявляют сильные признаки беспокойства (интенсивный груминг). Предварительное внутривенное введение АРНС1 в дозе 0,1 мг/кг значительно ослабляло вызываемое капсаицином поведение (рис.8).

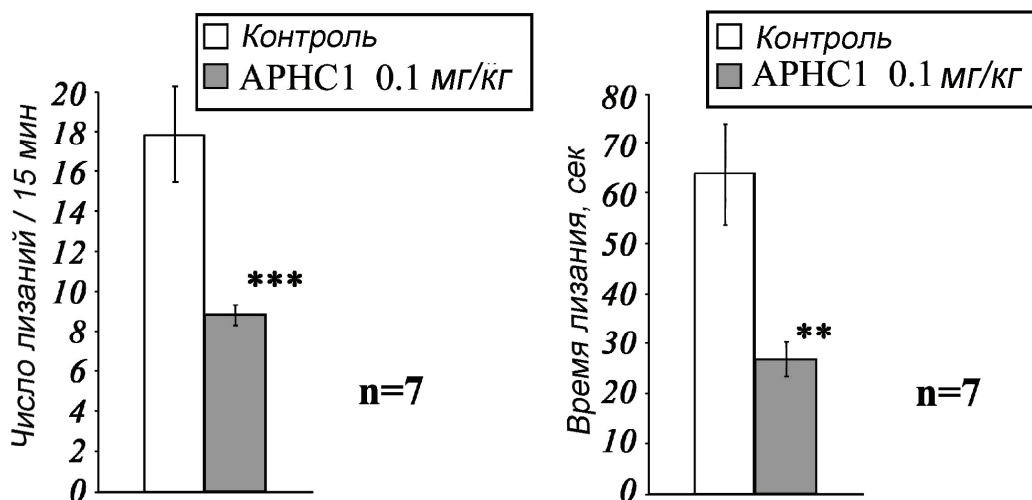


Рис. 8. Капсаициновый тест. Рекомбинантный АРНС1 растворяли в стерильном физрастворе и вводили мышам внутривенно в дозе 0,1 мг/кг. Контрольные животные получали эквивалентный объем (200 мкл) стерильного физиологического раствора. Тестирование проводили через 15 мин после введения. После введения 3 мкг капсаицина в подушечку задней лапы подсчитывали: А. количество лизаний лапы за 15 мин после введения капсаицина. Б. Время, которое мышь провела за лизанием лапы. Достоверность отличий от контроля определяли анализом вариабельности ANOVA и тестом Тьюки. Статистически достоверные различия отмечены ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,005$.

Это выражалось в уменьшении интенсивности (на ~52%) и времени (на ~57%) лизания лапы, а также в отсутствии груминга. Следует отметить, что все известные низкомолекулярные антагонисты TRPV1 также эффективны в этом тесте в дозах от 3 до 60 мг/кг.

Воспалительные реакции возникают при повреждении тканей или при аутоиммунных реакциях (например, при артрите). В лабораторных условиях боли при воспалении моделируются хирургическим вмешательством либо введением ряда веществ (CFA, карагенан, формальдегид). В каждом из этих случаев происходит стимуляция иммунной системы, что приводит к выбросу воспалительных медиаторов, таких как брадикинин и простагландины. Это, в свою очередь, приводит к значительному количеству эффектов, например, активируются или сенсibilизируются основные ноцицептивные нейроны и нейроны, участвующие в передаче ноцицептивного сигнала.

Гиперчувствительность сигнальных путей приводит к двум явлениям: аллоидии (болевого ответ на безопасную стимуляцию) и гиперчувствительности (усиленный болевой ответ на болезненную стимуляцию). Соответственно, действие анальгетических лекарств направлено на нормализацию ощущения боли.

Подкожное введение в подушку лапы мышам CFA вызывает сильную тепловую гиперчувствительность. Внутривенное введение APHC1 в дозе 0,1 мг/кг в значительной мере ослабляет тепловую гиперчувствительность мышей, инъецированных CFA (рис.9).

Известно, что у мышей, нокаутных по гену TRPV1, не наблюдается тепловой гиперчувствительностью после введения CFA. Ряд низкомолекулярных антагонистов TRPV1 также обладает способностью уменьшать тепловую гиперчувствительность в этом тесте на 40-100% в дозах 10-300 мг/кг.

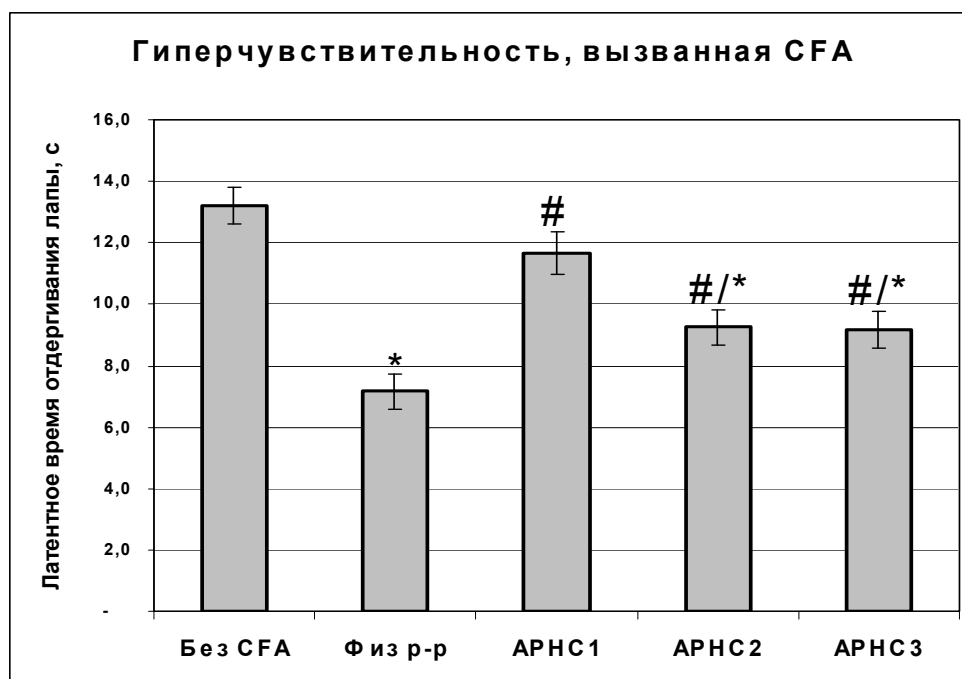


Рис. 9. Тепловая гиперчувствительность вызванная CFA. Мыши были разделены на 5 групп по 10 особей в каждой: в подушечку задней лапы группе «Без CFA» вводили 20 мкл физраствора, всем остальным группам - 20 мкл смеси CFA/физраствор 1:1. Через 24 часа группам «Без CFA» и «Физ р-р» вводили внутривенно 200 мкл физраствора, остальным группам такой же объем растворов АРНС1, АРНС2, АРНС3 в физрастворе (в дозе 0,1 мг/кг). Тестирование проводили через 15 мин после внутривенного введения. Измерялось латентное время отдергивания соответствующей лапы от горячей пластины ($t=53^{\circ}\text{C}$). Достоверность отличий от контроля определяли анализом вариабельности ANOVA и тестом Тьюки. Статистически достоверные различия отмечены от группы «Без CFA» * - $p<0,05$; от группы «Физ р-р» # - $p<0,05$.

Полученные данные свидетельствуют о том, что АРНС1 обладает анальгетическим действием в *in vivo* моделях стимуляции боли. Изменение болевой чувствительности в тестах горячей пластины и отдергивания хвоста соответствовало ранее описанному для нокаутных по TRPV1 мышей. АРНС1 также подавляет вызываемое капсаицином болевую реакцию более чем на 50% и уменьшает тепловую гиперчувствительность, вызванную CFA. Все это подтверждает, что АРНС1 эффективно блокирует передачу болевого сигнала через TRPV1 в моделях *in vivo*, несмотря на неполное ингибирование капсаицин-индуцированных токов, наблюдавшееся в электрофизиологических экспериментах на TRPV1 рецепторах, экспрессированных в ооцитах *Xenopus laevis*.

Следует отметить, что эффект полипептида проявляется в достаточно низких дозах – от 0,025 до 0,1 мг/кг (от 4 до 16 нМ/кг), с учетом объема крови мыши (~8% от массы тела) концентрация АРНС1 в крови составляет от 50 до 200 нМ. Это говорит о полной биодоступности АРНС1, так как эффект проявляется в диапазоне концентраций между значениями EC_{50} и концентрацией максимального эффекта, полученных в экспериментах на экспрессированных в ооцитах TRPV1 рецепторах. Этого чаще всего не наблюдается при тестировании *in vivo* низкомолекулярных антагонистов TRPV1.

Введение полипептидов АРНС2-3 (до 1мг/кг) также не оказывает никаких токсических эффектов на мышей и не нарушает их нормального поведения (при введении 0.1мг/кг) по данным оптомоторного теста.

Полипептиды АРНС2-3 обладали различной анальгетической активностью в тесте горячей пластины. Анализ минимальной действующей дозы полипептидов показал, что наибольшим анальгетическим потенциалом обладает АРНС1. АРНС2 был активен только в дозах от 0,1 мг/кг и проявлял наименьший эффект. АРНС3 проявляет близкую к АРНС1 активность и эффективно увеличивает латентное время облизывания задних лап в дозе 0,05мг/кг, а время подпрыгивания в дозе 0,025 мг/кг. Это подтверждает данные по сравнительной активности этих полипептидов, полученные в

электрофизиологических экспериментах на ооцитах с экспрессированным TRPV1.

Внутривенное введение АРНС2-3 в дозе 0,1 мг/кг в одинаковой степени ослабляет тепловую гиперчувствительность мышей, инъецированных СФА (рис.9). По сравнению с АРНС1 анальгетический эффект АРНС2-3 в этом тесте выражен значительно слабее.

Моделирование пространственной структуры АРНС1 и определение функционально важных остатков.

Строение полипептидов АРНС1-3 позволяет предположить наличие у их молекул пространственной укладки типа ВРТИ/Kunitz, который хорошо изучен на модели ВРТИ и дендротоксинах.. ВРТИ является мощным ингибитором трипсина, а змеиные дендротоксины (например, DTX1, DTXK, DTX α) – одними из самых мощных ингибиторов K⁺ каналов. Такой же тип пространственной укладки молекулы имеют: кальциклидин из яда змеи *Dendroaspis angusticeps*, блокирующий Ca²⁺ каналы L-типа, а также многие ингибиторы сериновых протеаз из беспозвоночных и позвоночных животных, и блокаторы K⁺ каналов из морских анемонов. Тот факт, что отдаленные виды животных используют один и тот же тип пространственной укладки полипептидных молекул для разнообразных функций, показывает, что он дает значительные преимущества в конструировании компактных и вариабельных участков связывания с различными клеточными компонентами.

Обнаруженные нами молекулы АРНС1-3 обладают способностью ингибировать TRPV1 рецептор, Следовательно, эта функция также может быть добавлен к списку активностей, проявляемых молекулами ВРТИ/Kunitz типа.

Известно, что 6 аминокислотных остатков ингибиторов протеаз формируют поверхность связывания с сериновыми протеазами. Несмотря на высокий уровень гомологии с ингибитором трипсина SHPI-1, строение связывающей поверхности полипептидов АРНС1-3 с активным центром сериновых протеаз имеет значительные отличия. Так у АРНС1-2 изменены четыре, а у АРНС3 три из 6 аминокислотных остатков, необходимых для

эффективного ингибирования трипсина. Однако, по-видимому, 2-3 оставшихся неизменными аминокислотных остатков в совокупности с общим строением молекулы достаточно для сохранения способности взаимодействовать с сериновыми протеазами. Однако константы ингибирования трипсина и химотрипсина полипептидов АРНС1-3 уменьшились более чем в 1000 раз по сравнению с SHPI-1.

Сравнение полипептидов АРНС1-3 между собой, а также с гомологами НС6107 и SHPI-1 позволяет предположить потенциально важные остатки для связывания с TRPV1. Так, во всех ингибиторах TRPV1 присутствует Arg48, и, соответственно, остаток Arg отсутствует в этой позиции в полипептидах НС6107 и SHPI-1. Поскольку полипептиды АРНС1-3 обладают различной ингибирующей способностью, то очевидно, что есть и другие остатки необходимые для связывания с рецептором (рис.10).

| | |
|--------|---|
| АРНС1 | GSICLEPKVVGPC TAYFR RFYFDSETGKCT V FIYGGCEGNGNNFETL R ACRAICRA |
| АРНС2 | GSICLEPKVVGPC TAYFR RFYFDSETGKCT P FIYGGCEGNGNNFETL R ACRAICRA |
| АРНС3 | GSICLEPKVVGPC TAYF PRFYF N SETG K CT P FIYGGCEGNGNNFETL R ACRGICRA |
| НС6107 | GSICLEPKVVGPC TAYF PRFYFDSETGKCT P FIYGGCEGNGNNFETL H ACRAICRA |
| SPH1 | S IC S EPK K VGR C KGYFPRFYFDSETGKCT P FIYGG C GNGNNFETL H Q C RAICRA |

Рис. 10. Сравнение последовательностей АРНС1, АРНС2, АРНС3, SHPI-1, НС6107. Идентичные аминокислотные остатки выделены серым. Аминокислотные остатки, потенциально важные для связывания с TRPV1 выделены жирным шрифтом.

Построение пространственных моделей позволило выявить некоторые структурные особенности ингибиторов TRPV1, которые видимо, определяют их связывание с рецептором. Все три полипептида содержат по 2 положительно заряженных аминокислотных остатка на одной поверхности молекулы (для АРНС1,2 это Arg18 и Arg48, а для АРНС3 – Lys23 и Arg48). Причем положительно заряженные группы этих аминокислотных остатков могут располагаться примерно на одинаковом расстоянии друг от друга. У АРНС1 на этой поверхности так же расположен гидрофобный остаток Val31, который, по-видимому, определяет большую ингибиторную активность этого пептида по отношению к TRPV1 в сравнении с АРНС2. Известно, что связывающие участки

токсинов обычно представляют собой комбинацию заряженных и гидрофобных аминокислот (например, блокаторы K^+ каналов). Так как аргинин/лизин-богатые пептиды и пептоидные молекулы обладают способностью в больших концентрациях блокировать TRPV1 в *in vitro* и *in vivo* экспериментах, то можно предположить, что в активном сайте APHC1 тоже находятся положительно заряженные аминокислотные остатки.

Механизм действия APHC1.

TRPV1 считается полимодальным детектором разнообразных физических и химических стимулов, вызывающих боль. Его активируют как экзогенные лиганды (капсаицин $EC_{50}=0.7$ мкМ, резинифератоксин $EC_{50}=40$ нМ), так и эндогенные (анандамид и др.), температура более $43^{\circ}C$, экстрацеллюлярный pH ниже 6.5.

Взаимодействие APHC1 с TRPV1 приводит к уменьшению ответа на капсаицин. Наиболее вероятно, что APHC1 связывается с экстрацеллюлярными доменами рецептора, которые формируют вестибюль канала. При этом, по-видимому, пора канала остается свободной, в противном случае происходила бы полная блокада канала как это описано для блокатора канала Rutenium Red.

APHC1 – высокоаффинный ($EC_{50}=54\pm 4$ нМ), но не очень сильный ингибитор TRPV1 (максимальное ингибирование $32\pm 9\%$). Кроличьи поликлональные антитела (Ab156H) к экстрацеллюлярной петле крысиного TRPV1 (E600-P623) обладают схожим с APHC1 эффектом ингибирования. Эти антитела только частично блокируют капсаицин- и анандамид-индуцируемые токи (максимальное ингибирование составляет 55%) даже в насыщающих концентрациях. Они, по-видимому, частично блокируют закрытое состояние канала. Возможно таким же образом действуют и полипептиды APHC1-3. Тот факт, что их функционально важными остатками предположительно являются положительно заряженные аминокислоты, не исключает возможности их взаимодействия с остатком E600 TRPV1, который считается важным для модуляции активности этого рецептора. Однако, пока нельзя исключить и других мест связывания APHC1.

ВЫВОДЫ

1. В экстракте нематоцитов морской анемоны *Heteractis crispa* обнаружен первый полипептидный модулятор ванилоидного рецептора, названный АРНС1. Идентифицированы его структурные гомологи – полипептиды АРНС2 и АРНС3. Комбинацией методов белковой химии и генной инженерии установлена первичная структура трех найденных полипептидов.
2. Определена биологическая активность АРНС1 и показано, что он ингибирует капсаицин-индуцируемые токи TRPV1 с $EC_{50}=54\pm4$ нМ и является слабым ингибитором сериновых протеаз.
3. Разработан метод получения рекомбинантных АРНС1, АРНС2, АРНС3. Выход целевых полипептидов с 1 литра культуры клеток *E.coli* составлял для АРНС1 – 3,3 мг; для АРНС2 и АРНС3 около 8 мг.
4. Выявлены анальгетические свойства полипептидов АРНС1-3. Показано, что АРНС1 значительно ослабляет болевой эффект, вызываемый введением мышам капсаицина - селективного агониста TRPV1. Полипептиды АРНС1-3 в дозе 0,1 мг/кг проявляют анальгетический эффект в *in vivo* моделях тепловой стимуляции боли и воспалительной гиперчувствительности, вызванной CFA.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Andreev Ya.A., Kozlov S.A., Koshelev S.G., Ivanova E.A., Monastyrnaya M.M., Kozlovskaya E.P., 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(35), 23914-23921.
2. 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(5), 688-691.

Патенты:

Козлов С.А., Андреев Я.А., Кошелев С.Г., Иванова Е.А., Лейченко Е.В., Козловская Э.П., Гришин Е.В. Полипептид актинии, обладающий анальгетическим действием. №2368621 (2008)

Тезисы докладов:

1. Андреев Я.А., Иванова Е.А., Козлов С.А., Кошелев С.Г., Козловская Э.П., Гришин Е.В. Природная комбинаторная библиотека пептидов семейства BPTI/Kunitz типа в актинии *Heteractis crispa*. Тезисы стендовых сообщений III Российского симпозиума «Белки и пептиды», Пущино, 16-21 сентября, **2007**, с. 6.
2. Андреев Я.А., Иванова Е.А., Козлов С.А., Кошелев С.Г., Гришин Е.В. Поиск природных модуляторов TRPV1 рецептора. Тезисы докладов и стендовых сообщений XX зимней международной молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» Москва, 11–15 февраля, **2008**, с.69
3. Grishin E., Andreev Y. Polypeptide inhibitor of TRPV1 receptor from the sea anemone *Heteractis crispa*. In Abstract book of The European Section Meeting of the International Society on Toxicology. 7-10 September, **2008**, Leuven, Belgium, p.16-17.
4. Гришин Е.В., Андреев Я.А. Фармакологический потенциал пептидных модуляторов ионотропных рецепторов. Тезисы докладов международной конференции «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга» Санкт-Петербург, 10-12 сентября, **2008**, с.34.
5. Андреев Я.А., Козлов С.А., Гришин Е.В.. Пептидный модулятор TRPV1 рецептора, обладающий анальгетическим действием. Тезисы докладов международной конференции «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга» Санкт-Петербург, 10-12 сентября, **2008**, с. 7-8.
6. Андреев Я.А., Козлов С.А., Гришин Е.В. Анальгетическое действие пептидного ингибитора TRPV1 рецептора. Сборник тезисов 12-ой международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». 10-14 ноября, **2008**., Пущино, с. 119-120.
7. Андреев Я.А., Козлов С.А., Гришин Е.В. Комбинаторные библиотеки полипептидов как источник новых целевых лекарственных препаратов. Комбинаторная библиотека морской анемоны *Heteractis crispa*. Сборник тезисов докладов участников Международного конкурса научных работ молодых ученых в области нанотехнологий. Международный форум по нанотехнологиям. Rusnanotech08. 3-5 декабря, **2008**, Москва, с. 562-563.