

**Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук**

На правах рукописи

Логашина Юлия Александровна

**ПЕПТИДЫ МОРСКИХ АНЕМОН, МОДУЛИРУЮЩИЕ
АКТИВНОСТЬ TRPA1 РЕЦЕПТОРОВ**

Специальность 02.00.10 — Биоорганическая химия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Андреев Ярослав Алексеевич

Москва - 2018

Оглавление

1. Введение	5
Цели и задачи.....	6
2. Обзор литературы	7
2.1. Введение.....	7
2.2. Механизм восприятия боли.....	9
2.2.1. Ноцицепторы.....	9
2.2.2. Передача болевого сигнала	11
2.3. TRP семейство.	12
2.3.1. Эволюция TRP семейства.....	13
2.3.2. Характерные структурные свойства.....	16
2.3.3. Локализация TRP каналов и их функции.....	19
2.4. Рецептор TRPA1	23
2.4.1. История открытия.....	23
2.4.2. Структура рецептора TRPA1.....	25
2.4.3. Физиологические функции рецептора TRPA1	31
2.4.3.1. <i>Хемочувствительность</i>	31
2.4.3.2. <i>Термочувствительность</i>	36
2.4.3.3. <i>Механочувствительность</i>	40
2.5. Патофизиологические процессы с участием TRPA1.....	41
2.6. Модуляторы рецептора TRPA1 и их клинические перспективы	48
2.6.1. Агонисты TRPA1	49
2.6.2. Антагонисты TRPA1	52
2.6.3. Кандидаты в клинические исследования и лекарственные препараты	57
3. Материалы и методы	60
3.1. Материалы и оборудование	60

3.1.1.	Реактивы и материалы	60
3.1.2.	Биологический материал и животные	60
3.1.3.	Бактериальные штаммы и плазмидные векторы	61
3.1.4.	Среды для выращивания бактерий	61
3.1.5.	Оборудование.....	61
3.2.	Методы	63
3.2.1.	Получение и подготовка образцов ядов актиний.....	63
3.2.2.	Выделение активных компонентов из ядов актиний	64
3.2.3.	Масс-спектрометрический анализ (МС)	64
3.2.4.	Восстановление дисульфидных связей и алкилирование SH-групп.....	65
3.2.5.	Анализ аминокислотной последовательности.....	66
3.2.6.	Определение нуклеотидной последовательности предшественников.....	66
3.2.7.	Синтез генов, кодирующих пептиды.....	67
3.2.8.	Получение рекомбинантных аналогов пептидов	69
3.2.9.	ЯМР-спектроскопия	69
3.2.10.	Биоинформационные методы	71
3.2.11.	Тестирование антимикробной активности	71
3.2.12.	Тестирование активности на TRPA1 рецепторе	72
3.2.12.1.	<i>Кальциевый имиджинг на клетках CHO.....</i>	72
3.2.12.2.	<i>Кальциевый имиджинг на DRG нейронах</i>	73
3.2.12.3.	<i>Электрофизиологическое тестирование.....</i>	74
3.2.13.	Тестирование на животных моделях.....	75
3.2.13.1.	<i>Анализ болевого поведения, вызываемого веществом.....</i>	76
3.2.13.2.	<i>Тест «Открытое поле» для изучения поведения мышей</i>	76
3.2.13.3.	<i>АИТС-индуцируемое ноцицептивное поведение</i>	76
3.2.13.4.	<i>CFA-индуцируемое воспаление и тепловая гипералгезия</i>	77

3.2.13.5. <i>Капсаициновый тест</i>	77
4. Результаты и обсуждения	78
4.1. Выделение пептидных модуляторов из ядов морских анемонов и установление их структуры	78
4.1.1 Полипептид из яда актинии <i>Metridium senile</i>	78
4.1.2 Полипептид из яда актинии <i>Urticina eques</i>	83
4.2. Получение рекомбинантных аналогов пептидов	94
4.2.1. Получение рекомбинантного аналога Ms 9a-1	94
4.2.2. Получение рекомбинантного аналога Ueq 12-1	94
4.3. Исследование биологической активности пептидов <i>in vitro</i>	95
4.3.1. Исследование активности пептида Ms 9a-1	96
4.3.1.1. <i>Потенцирование AITC-индуцированного ответа клеток CHO-rTRPA1</i> .	96
4.3.1.2. <i>Электрофизиологическое тестирование на ооцитах Xenopus laevis, экспрессирующих rTRPA1</i>	97
4.3.1.3. <i>Исследование на DRG нейронах, экспрессирующих TRPA1</i>	99
4.3.2. Исследование активности пептида Ueq 12-1	101
4.3.2.1. <i>Антибактериальная активность</i>	101
4.3.2.2. <i>Потенцирующий эффект пептида на активность рецептора TRPA1</i> ...	102
4.4. Исследование биологической активности пептидов <i>in vivo</i>	104
4.4.1. Исследование активности пептида Ms 9a-1 на мышах	106
4.4.2. Исследование активности пептида Ueq 12-1 на мышах	109
5. Заключение	113
6. Выводы	116
7. Список сокращений	117
Ссылки	119

1. Введение

В процессе эволюции органического мира боль превратилась в сигнал опасности, стала важным биологическим фактором, обеспечивающим сохранение жизни особи, а, следовательно, и вида. Врождённая нечувствительность к боли - это когнитивная аномалия, при которой человек не способен воспринимать болевые стимулы. Такие люди не чувствуют боли от острых предметов и пламени, или дискомфорта от сломанной кости, не знают, какую силу следует прилагать для выполнения обычных движений, из-за чего хронические воспалительные процессы являются их постоянными спутниками, что представляет значительную угрозу их жизни.

Однако сбои в передаче болевых сигналов чаще ведут к гиперчувствительности, состоянию, в котором боль перестаёт быть полезной и становится хронической и изнурительной. В определённом смысле гиперчувствительность - часть процесса выздоровления. Например, солнечный ожог вызывает временную сенсibilизацию в повреждённой области. В результате, обычные безобидные стимулы, такие как лёгкое прикосновение или тепло, воспринимаются как болезненные (состояние, называемое аллодинией), или болезненные стимулы вызывают боль большей интенсивности (состояние, называемое гипералгезией). В других случаях сенсibilизация может мешать выздоровлению. Артрит, постгерпетическая невралгия и рак костей вызывают интенсивную и часто хроническую боль, которая изматывает как физиологически, так и психологически, и затрудняет восстановление.

Хронический болевой синдром может инициироваться и поддерживаться на периферии и/или в центральной нервной системе. В любом случае изучение молекул и клеток, которые отвечают за восприятие болевых стимулов, является ключом к пониманию механизмов, лежащих в основе гиперчувствительности.

Цели и задачи

Целью данной работы являлся поиск, выделение и характеристика пептидов морских анемонов, модулирующих активность TRPA1 рецептора. В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. клонирование гена TRPA1 крысы
2. получение эктодермальных экстрактов, яда и защитной слизи актиний;
3. тестирование полученных экстрактов на наличие искомой активности;
4. выделение активных компонентов с помощью хроматографических методов;
5. анализ активности выделенных компонентов на клеточных линиях (CHO, DRG нейроны) и на ооцитах *Xenopus laevis*, экспрессирующих рецептор TRPA1;
6. исследование физико-химических свойств активных веществ;
7. разработка системы гетерологической экспрессии пептидов, модулирующих TRPA1;
8. исследование активности полученных лигандов в моделях *in vivo*.

2. Обзор литературы

2.1. Введение

Одним из способов изучения механизмов восприятия боли является исследование ионных каналов и рецепторов, участвующих в передаче болевого сигнала. Молекулы, модулирующие сенсорные системы живых организмов, являются инструментами, которые помогают изучать ионные каналы и рецепторы. Болевые сигналы имеют различную природу и могут поступать как из окружающей среды, так и от внутренних органов. Среди всех экспрессируемых сенсорной системой рецепторов, воспринимающих потенциально вредные стимулы, в передаче практически всех видов болевых сигналов участвует рецептор TRPA1. Он детектирует вредное действие окружающей среды (химическое раздражение, механическое воздействие и низкие температуры), вызывающее острую боль; а также активируется под действием изменения внутренней среды организма, то есть при воспалении, которое часто сопровождается хронической болью.

Рецептор TRPA1 играет роль регулятора нейрогенного воспаления. Он экспрессируется в чувствительных нейронах, иннервирующих различные ткани, такие как кожа, эпителий кишечника и лёгких, слизистая мочевого пузыря. При местном применении агонисты TRPA1 вызывают жжение, механическую и термическую гиперчувствительность, а также нейрогенное воспаление [1–3]. Гиперэкспрессия рецептора в коже приводит к возникновению хронического зуда при атопических и аллергических контактных дерматитах [4–7]. Летучие вредные вещества (акролеин, озон, изотиоцианаты, слезоточивый газ, хлорин) и аллергены взаимодействуют с экспрессирующимся в дыхательной системе TRPA1 [8–10] вызывая кашель, чихание и образование слизи.

Активаторы TRPA1 образуются в организме при воспалении или бактериальной инфекции, а в нейронах находящихся рядом с повреждёнными тканями в ответ на нейровоспалительные сигналы часто наблюдается гиперэкспрессия TRPA1 [11]. Образование эндогенных агонистов TRPA1 (например, 4-HNE, H₂O₂) и провоспалительных агентов (например, брадикинин, NGF) сопровождает хронические заболевания дыхательной системы [12,13]: воспаление тканей, астму, химическую гиперчувствительность, хронический бронхит, хроническое обструктивное заболевание

легких. Метилглиоксаль, накапливающийся в клетках при диабете [14,15] и хронической болезни почек [15], непосредственно активирует TRPA1 и, как следствие, стимулирует развитие болевой нейропатии [16,17]. Рецептор детектирует присутствие воспалительных агентов в кишечнике и передает сигналы в спинной мозг, одновременно инициируя высвобождение нейропептидов из нервных окончаний [18,19]. Интерстициальный цистит или синдром болезненного мочевого пузыря вызывает уротоксичный агонист TRPA1, акролеин, который накапливается в моче и повреждает слизистую оболочку [20]. Противоопухолевая химиотерапия вызывает термическую и механическую аллодинию за счёт сенсibilизации и активации TRPA1, экспрессия которого возрастает под влиянием химической среды, которую создают раковые клетки [21,22]. При ишемии антагонисты TRPA1 препятствуют разрушению миелиновой оболочки и, как следствие, нарушению работы головного мозга [23].

Изучение рецептора TRPA1 способствует пониманию механизмов возникновения и восприятия боли и открывает возможность для создания анальгетических и противовоспалительных препаратов, регулирующих его активность при различных патологических состояниях.

Модуляторы TRPA1 относятся к разным классам химических соединений. Все агонисты рецептора можно разделить на неорганические вещества и низкомолекулярные органические соединения. Большинство антагонистов TRPA1 – синтезированные фармацевтическими компаниями низкомолекулярные органические соединения. В яде тарантула (*Thrixopelma pruriens*) [24] и бразильского странствующего паука (*Phoneutria nigriventer*) [25] были найдены два пептидных модулятора рецептора TRPA1. Оба пептида являются неселективными ингибиторами TRPA1.

Исследования показали, что как антагонисты, так и агонисты, играют важную роль в модулировании активности рецептора при патологических состояниях, поэтому их поиск является актуальной задачей на сегодняшний день.

2.2. Механизм восприятия боли

2.2.1. Ноцицепторы

Процесс восприятия интенсивных термических, механических или химических стимулов группой периферических нервных волокон называется ноцицепцией, а волокна – ноцицепторами [26]. Ноцицепторы имеют две аксональные ветви: периферическую и центральную; их тела находятся в спинно-мозговых узлах (DRG), узловатых ганглиях (NG) или тригеминальном узле (TG) [27] (рис. 1). В зависимости от расположения тела клетки периферическая ветвь иннервирует тело человека или лицо, а центральная ветвь иннервирует спинной мозг.

Ноцицепторы возбуждаются только под действием потенциально вредных стимулов и делятся на два класса [28] (рис. 2). К первому относятся миелинизированные чувствительные нейроны среднего диаметра (А δ), которые передают сигналы о «первичной» или острой боли. Эти нейроны значительно отличаются от высоко проводящих А β волокон большого диаметра, которые отвечают за восприятие безболезненных механических стимулов (например, лёгкое прикосновение). Ко второму классу ноцицепторов относятся немиелинизированные «С» волокна маленького диаметра, которые передают сигналы о «вторичной» или медленной боли.

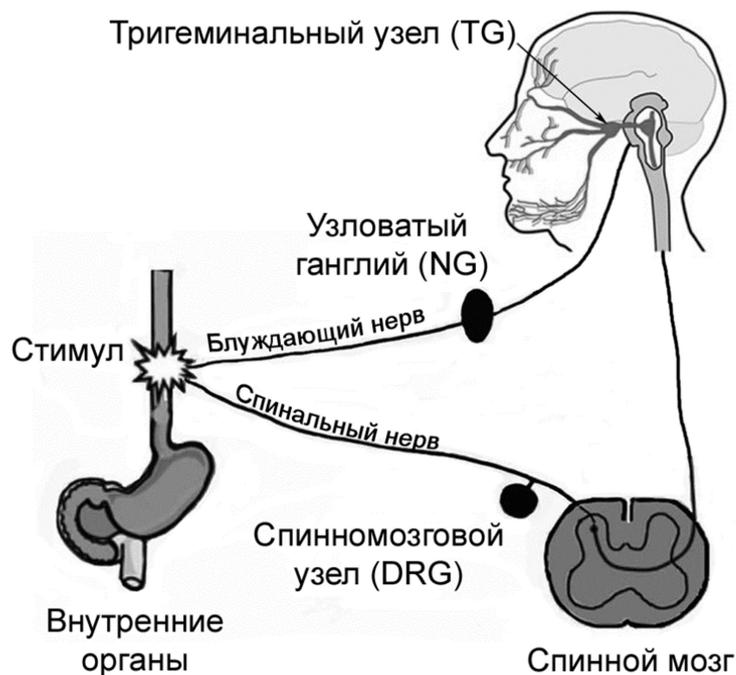


Рисунок 1. Схема ноцицептивных путей.

Согласно электрофизиологическим исследованиям Аδ ноцицепторы делятся на два типа. Нейроны I типа – механические ноцицепторы с высоким порогом тепловой чувствительности ($>50^{\circ}\text{C}$), которые сенсibiliзируются при повреждении тканей, то есть, тепловой или механический порог чувствительности становится ниже. Если тепловой стимул поддерживать некоторое время, то нейроны I типа отвечают и на температуры менее 50°C . Аδ ноцицепторы II типа имеют более низкий тепловой порог чувствительности и более высокий механический. Сигнал о «первичной» острой боли от прикосновения к горячим предметам поступает именно по нейронам II типа, а болевой сигнал от укола булавкой передаётся ноцицепторами I типа.

Немиелинизированные «С» волокна в основном полимодальные, то есть воспринимают как термические, так и механические стимулы, [29]. Особый интерес представляют термочувствительные немиелинизированные ноцицепторы, отвечающие на механическое воздействие только при повреждении («тихие» ноцицепторы) [30]. Эти нейроны более чувствительны к химическим стимулам (капсаицин или гистамин), чем полимодальные, и, вероятно всего, активируются под действием изменяющейся химической среды в очаге воспаления. Кроме того, «тихие» ноцицепторы реагируют на различные аллергены, вызывающие зуд. Однако не все «С» волокна являются ноцицепторами. Часть нейронов отвечает на понижение температуры или приятные прикосновения, такие как поглаживание волосков на коже [31].

Нейроанатомическое и молекулярное исследования ноцицепторов показали гетерогенность «С» волокон на химическом уровне [32]. Например, пептидергические «С» ноцицепторы выделяют нейропептиды (вещество P (SP) и кальцитонин-ген-связанный пептид (CGRP)) и экспрессируют нейротрофический рецептор TrkA, с которым взаимодействует фактор роста нервной ткани (NGF). Непептидергические «С» ноцицепторы экспрессируют нейротрофический рецептор c-Ret, который является мишенью для глиального нейротрофического фактора (GDNF) и изолектина IB4; рецепторы, сопряжённые с G-белком из семейства Mrg [33], пуринергические рецепторы P2X₃ и др.

Ноцицепторы можно также классифицировать по экспрессируемым ими каналам, которые делают нейроны чувствительными к теплу (TRPV1), холоду (TRPM8), кислой среде (ASICs), и множеству химических раздражителей (TRPA1) [34].

Все перечисленные функционально- и молекулярно-гетерогенные классы ноцицепторов участвуют в передаче различных болевых сигналов.

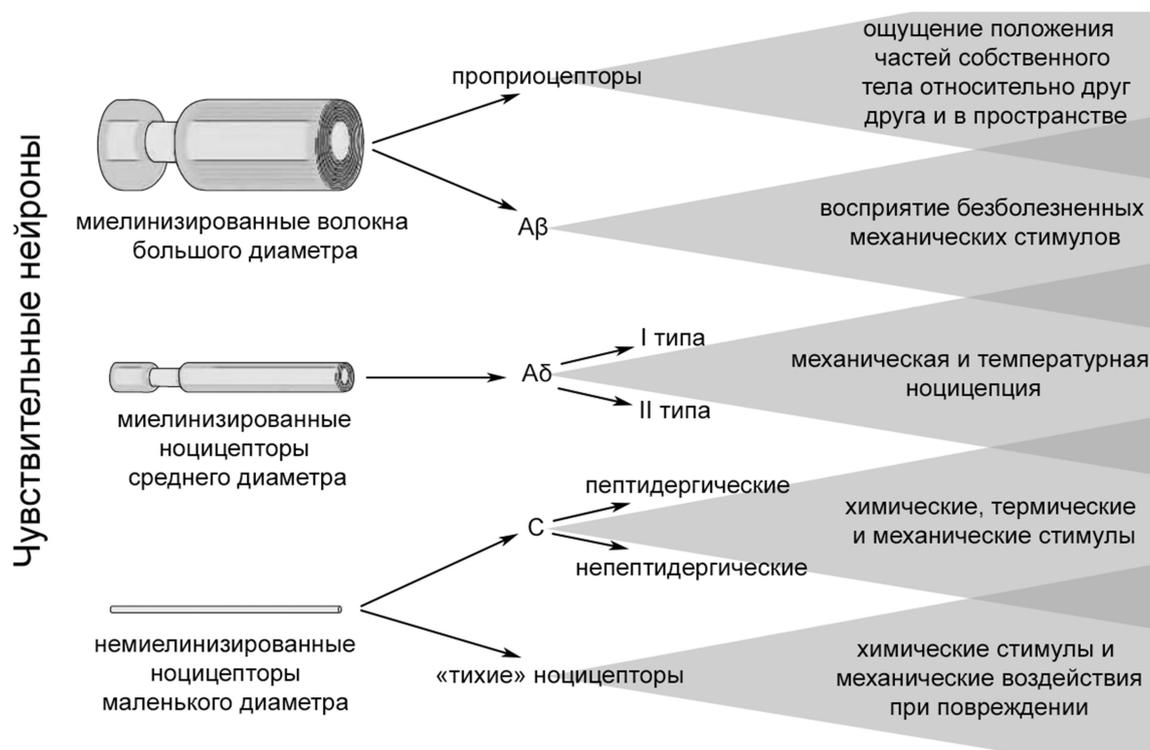


Рисунок 2. Классификация чувствительных нейронов и их функции.

2.2.2. Передача болевого сигнала

Аксоны ноцицепторов выходят из общего стебелька, и большинство синтезируемых ими веществ доставляется как к периферическим, так и к центральным окончаниям. Эта особенность отличает первичные чувствительные нейроны от типичных нейронных клеток, у которых воспринимающая ветвь (дендриты) отличается от передающей ветви (аксона) биохимическим составом. Эквивалентность центральных и периферических окончаний означает, что ноцицепторы способны посылать и получать сигналы от обоих аксонов (рис. 3). Окончания, иннервирующие спинной мозг, передают сигнал за счет выброса глутамата, АТФ, CGRP и SP, а окончания, иннервирующие периферические мишени, высвобождают молекулы (CGRP, SP и другие нейропептиды), которые влияют на окружающие их ткани. Нейрогенное воспаление – это процесс, при котором периферическое освобождение нейропептидов CGRP и SP, вызывает релаксацию гладкой мускулатуры в стенках кровеносных сосудов (вазодилатация) и выход белков плазмы в окружающие ткани (экстравазация) [26]. Помимо этого, только

периферические окончания ноцицепторов реагируют на различные стимулы окружающей среды (высокие или низкие температуры и механическое раздражение), в то время как оба ноцицептивных аксона являются мишенями большого количества эндогенных молекул (протоны, липиды, нейротрансмиттеры), которые регулируют чувствительность ноцицепторов.

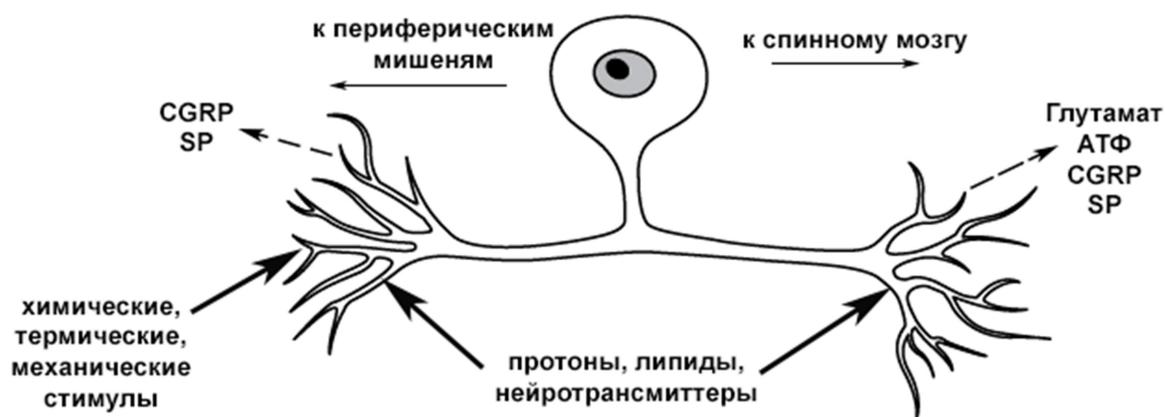


Рисунок 3. Ноцицепторы посылают и получают сигналы от обоих аксонов. Тела находятся в спинномозговых узлах (DRG), узловатых ганглиях (NG) или тройничном нерве (TG). Окончания, иннервирующие спинной мозг, выделяют глутамат, АТФ, CGRP и SP. Периферические окончания выделяют нейропептиды CGRP и SP и реагируют на химические, термические и механические стимулы. Оба ноцицептивных аксона являются мишенями протонов, липидов и нейротрансмиттеров.

2.3. TRP семейство.

Рецепторы временного потенциала (Transient Receptor Potential channels, TRP-каналы) относятся к суперсемейству интегральных мембранных белков, выполняющих функцию ионных каналов. Представители семейства встречаются у позвоночных, беспозвоночных и дрожжей. TRP семейство подразделяется на семь подсемейств [35]: TRPC (canonical - канонические), TRPV (vanilloid - ванилоидные), TRPM (melastatin - меластатиновые), TRPP (polycystin - полицистиновые), TRPML (mucolipin - миколипиновые), TRPA (ankyrin - анкириновые) и TRPN рецепторы (NOMPC-like, no mechanoreceptor potential C - подобные каноническим, но не воспринимающие

механическое воздействие), обнаруженные только у беспозвоночных и рыб (рис. 4). TRP каналы экспрессируются в различных тканях и органах, и участвуют во множестве физиологических процессов – от восприятия разнообразных стимулов до ионного гомеостаза. В основном представители семейства являются неселективными ионными каналами, однако, некоторые из них избирательно проницаемы только для ионов Ca^{2+} или сильно гидратированных ионов Mg^{2+} . Активации TRP каналов может происходить за счёт связывания с лигандом, при ковалентной модификации аминокислотных остатков, в следствии изменения разности потенциалов на мембране клетки или температуры окружающей среды. Открытие каналов вызывает деполяризацию клеточной мембраны и активацию различных потенциал-зависимых ионных каналов, в результате чего изменяется внутриклеточная концентрация ионов. TRP каналы участвуют в трансмембранном транспорте некоторых катионов (Na^+ , Ca^{2+} и Mg^{2+}) и функционировании внутриклеточных органелл (эндосомы и лизосомы). Мутации в некоторых *trp* генах приводят к различным патологиям: нейродегенеративным расстройствам, скелетной дисплазии, заболеваниям почек, хроническим болям и т.д.

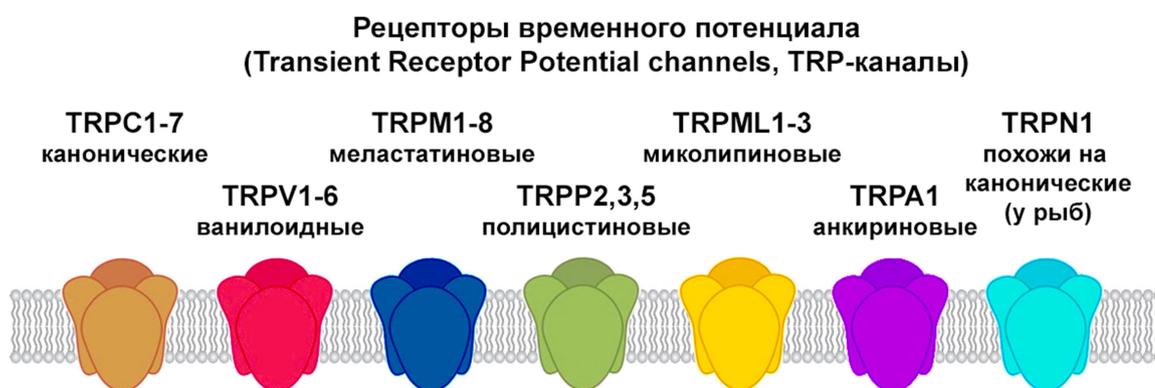


Рисунок 4. Семейство TRP-каналов животных.

2.3.1. Эволюция TRP семейства

TRP ген был впервые охарактеризован в процессе исследования зрительной системы плодовой мушки *Drosophila melanogaster*. Под действием длительного светового раздражения у мутантных слабовидящих мух наблюдалась неустойчивая электроретинограмма (ЭРГ) в отличие от особей дикого типа [36]. Подобный эффект был назван временным рецепторным потенциалом (Transient Receptor Potential - TRP).

Двадцать лет спустя американские ученые клонировали *trp* ген, отвечающий за нестабильное зрение дрозофил [37]. Анализ его нуклеотидной последовательности выявил структурное сходство закодированного белка с катионными каналами, а детальное исследование тока, индуцируемого светом в *trp* мутантах, установило, что носителями электрического заряда являются катионы Ca^{2+} [38]. Так как мутантные дрозофилы имели нормальный ответ на слабое освещение, сразу было выдвинуто предположение, что белок dTRP (*drosophila* TRP) не является светочувствительным каналом. Ca^{2+} токи, вызываемые светом в фоторецепторе *trp* мутантных мух, были значительно меньше по сравнению с диким типом, из чего был сделан вывод, что dTRP является основным селективным каналом для индуцируемого светом Ca^{2+} тока, и что есть второй канал ответственный за остаточную светочувствительность *trp* мутантных мух [39]. Примерно в то же время был обнаружен гомолог dTRP (TRPL- TRP-like) [40], который, по-видимому, отвечает за остаточный ответ на свет [41,42]. TRPL на 40% идентичен dTRP, и обе эти последовательности имеют структурное родство с семейством потенциал-зависимых кальциевых каналов с шестью трансмембранными участками [40]. Свойства нативных dTRP и TRPL были охарактеризованы на дрозофилах нокаутных по генам этих каналов. В гетерологических системах экспрессии было показано, что dTRP и TRPL проводят кальций и другие катионы [43–46].

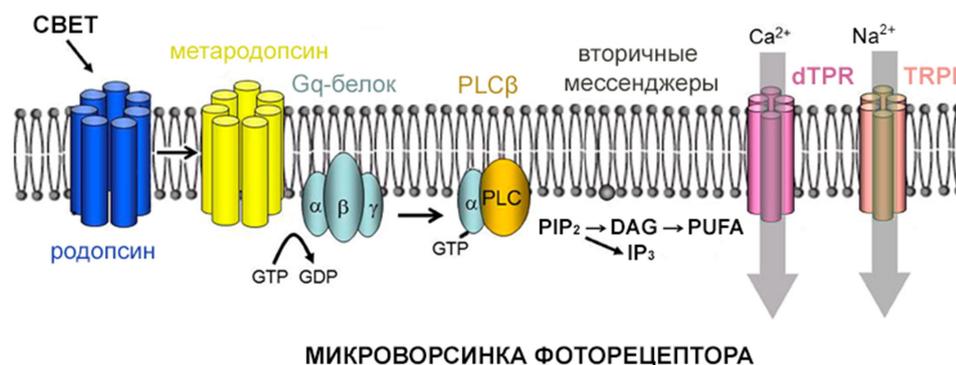


Рисунок 5. Родопсин поглощает фотон и фотоизомеризуется в метародопсин, который катализирует GTP-GDP обмен на α субъединице Gq-белка. GTP- α Gq диссоциирует и активирует фосфолипазу C (PLC β), которая гидролизует фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат (PIP₂) до инозитол-1,4,5,-трифосфата (IP₃) и диацилглицерола (DAG). DAG-липаза превращает DAG в полиненасыщенный жирные кислоты (PUFA). Один из вторичных мессенджеров активирует каналы dTRP и TRPL (изображена одна субъединица).

Последующие исследования установили полный механизм фототрансдукции у дрозофилы - он начинается с родопсина, проходит через сигнальный каскад G-белков, в результате Gq-белок активирует изоформу PLC β , что приводит к активации каналов dTRP и TRPL (рис. 5). Этот путь передачи сигнала является самым быстрым из известных каскадов через G-белки, что отчасти является следствием высокой компарментализации всех его частей [47,48].

К настоящему моменту известно более 100 *trp* генов у разных живых организмов. Размер *trp* генов у человека варьируется от 11,4 т.п.н. до 911 т.п.н., а количество экзонов от 11 до 39. Регуляторных элементов в промоторах *trp* генов не найдено.

Одни и те же подсемейства TRP каналов у разных видов живых организмов могут включать в себя различное число представителей. Гомология аминокислотных последовательностей TRP каналов, принадлежащих одному биологическому виду, составляет, как правило, 35%, однако, для определённых пар представителей (TRPC6 и TRPC7, TRPM4 и TRPM5, TRPV5 и TRPV6) гомология может достигать 50%–80%. Наибольшей гомологией обладают трансмембранные сегменты TRP каналов из одного подсемейства. TRPC («каноническое») подсемейство включает в себя наиболее близких гомологов dTRP. TRPV («ванилоидные») каналы названы в честь первого представителя - ванилоидного рецептора 1 (TRPV1). Подсемейство TRPM состоит из гомологов меластатина-1 (TRPM1). Группы каналов TRPML и TRPP состоят, соответственно, из гомологов муколипина 1 и полицистина 2 (мутации в этих генах приводят к муколипидозу типа IV и полицистозу почек, соответственно). Представители подсемейства TRPA относятся к ноцицептивным каналам и отличаются наличием большого числа анкириновых повторов (около 14). TRPN каналы названы в честь NOMP-C (NO-mechano-potential C) канала найденного в круглом черве *Caenorhabditis elegans*. У позвоночных единственный представитель TRPN семейства найден в рыбе данио [49].

Среди пяти основных природных царств: бактерий, простейших, растений, грибов и животных - *trp* гены обнаружены только у грибов и животных. Несмотря на большое количество геномных исследований, у наземных растений до сих пор не найдено ни одного *trp* гена. Однако в геноме зелёной водоросли *Ostreococcus tauri* обнаружено несколько *trp*-подобных генов, и один из них кодирует канал, принимающий участие в Ca²⁺ сигнальном пути [50].

У грибов единственный известный *trp*-подобный ген был найден в дрожжах. TrpY1, также известный как Yvc1, кодирует вакуолярный Ca²⁺-зависимый мембранный белок, являющийся датчиком осмотического давления [51–54]. Дрожжевой TRP канал сенсibiliзируется при растяжении вакуолярной мембраны [55,56] и при взаимодействии с индолом или другими ароматическими соединениями [52,53]. Взаимодействие с ароматическими лигандами подразумевает присутствие ароматических остатков в шестом трансмембранном домене дрожжевого канала. Эти остатки аналогичны аминокислотам, которые присутствуют в некоторых TRP каналах многоклеточных [52,53]. Поскольку белок TrpY1p только частично гомологичен известным TRP каналам, то его считают одним из древнейших механо- и хемосенсоров [57,58].

Хоанофлагелляты – одноклеточные эукариоты, представленные одиночными и колониальными формами, которые обитают в морских и пресных водах. Существует гипотеза, что у колониальной формы этих организмов образовалась Ca²⁺ сигнальная система, содержащая белки гомологичные мембранным каналам животных, к которым относятся кальциевые каналы, управляемые кальциевым депо, лигандами, потенциалом или вторичными мессенджерами, и пять подсемейств TRP каналов животных [59]. Таким образом, гены хоанофлагеллят скорее всего являются эволюционными предками первых представителей TRP семейства. В ходе эволюции большинство позвоночных утратило механочувствительные TRPN каналы, однако, практически в двое увеличилось количество TRP каналов участвующих в кальциевом и магниевом гомеостазах, термо- и хемочувствительности и кальциевой сигнализации (TRPC, TRPV и TRPM).

2.3.2. Характерные структурные свойства

Первые сведения о строении TRP каналов были получены на основе рентгеновской кристаллографии, компьютерного моделирования и структурно-функционального анализа. Позднее, используя метод криоэлектронной микроскопии, были получены более точные данные о структуре отдельных представителей семейства (TRPC3 [60], TRPV1 [61], TRPV2 [62], TRPA1 [63]). В основном TRP каналы имеют структуру гомотетромеров. Однако канал TRPP2 формируется тремя одинаковыми

субъединицами, которые связаны с гликопротеином полицистином-1 [64]. Известно несколько случаев формирования гетеромультимеров членами одного или разных подсемейств (например, представителями подсемейства TRPC) [65]. Некоторые гетеромерные каналы были получены в системах коэкспрессирующих разные субъединицы. Существование гетеромеров в природных клетках не доказано.

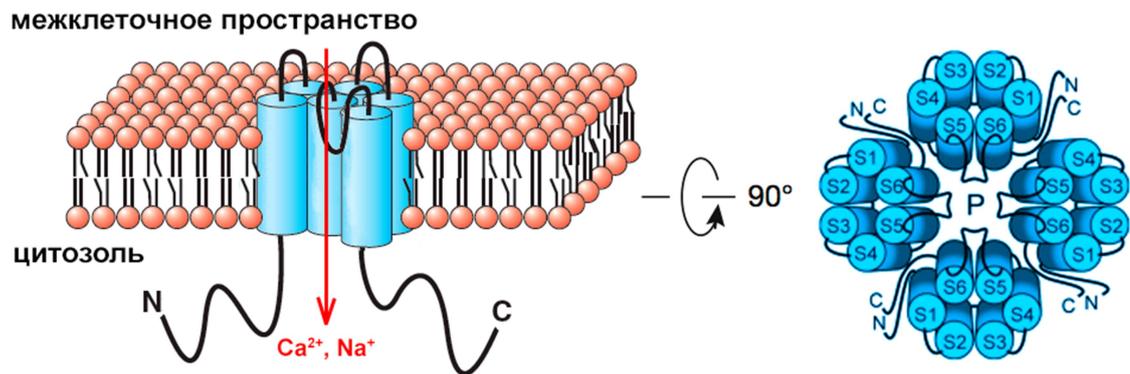


Рисунок 6. Схема строения TRP каналов. Мономеры TRP каналов состоят из шести трансмембранных сегментов (S1 – S6) и формирующей пору (P) возвратной петлём между S5 и S6. С и N концы находятся в клетке и различаются по длине и содержащимся в них доменам.

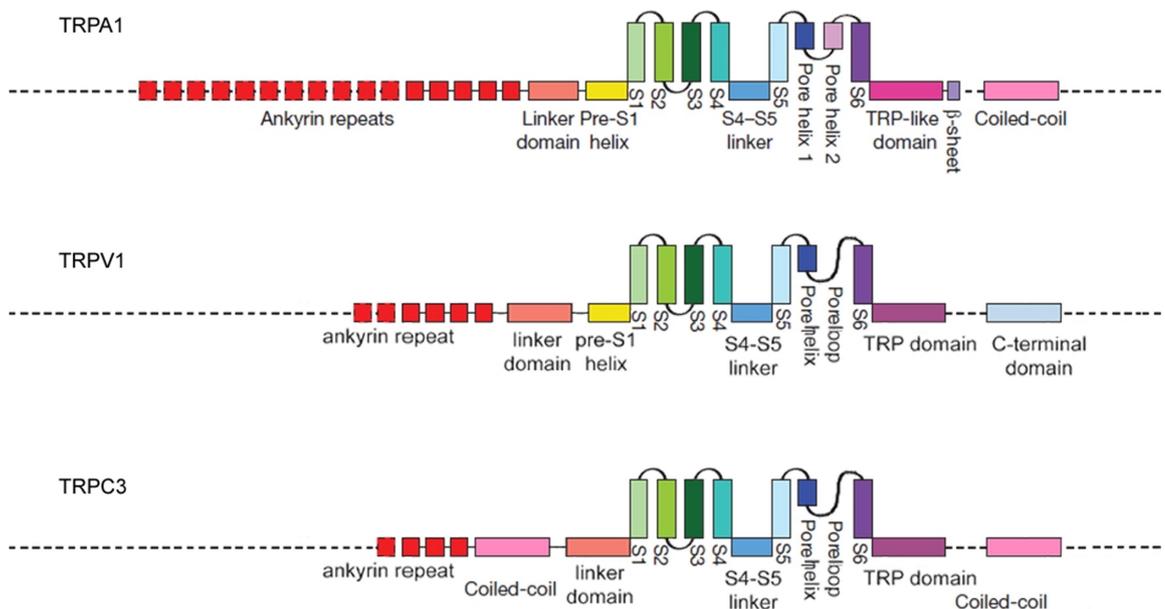


Рисунок 7. Схема распределения доменов в каналах TRPA1 [63], TRPV1 [61] и TRPC3 [66,67].

Мономерный TRP белок состоит из шести трансмембранных сегментов (S1 – S6) и петли между сегментами S5 и S6, которая формирует пору [68,69] (рис. 6). Внутриклеточные N- и C-концевые участки белка различаются по длине и содержащимся в них доменам [69] (рис.7). В некоторых случаях C-конец обладает полноценной ферментативной активностью. Например, фосфогидролазный домен TRPM2 функционирует как АДФ-рибоза пиррофосфатаза [70], а в TRPM7 присутствует α -киназный домен, который участвует в формировании межсубъединичных димеров. N-концы одной субъединицы взаимодействуют с C-концами другой, формируя внутриклеточный фермент [71]. На N-конце многих TRP каналов находятся анкириновые повторы – мотивы из 33 аминокислотных остатков, которые формируют в пространстве две антипараллельные α -спирали, соединённые β -шпилькой. Количество повторов в анкириновых доменах TRP подсемейств различается. Например, TRPC каналы содержат 3-4 повтора, у TRPV каналов их 6, в TRPA 14-18 повторов, а у TRPN 29. Считается, что роль анкиринового домена состоит в белок-белковых взаимодействиях: тетрамеризации канала и связывании с лигандами и белками-партнёрами [72]. Анкириновые домены TRPV1, TRPV3 и TRPV4 связывают АТФ, который конкурирует за связывание с кальмодулином – белком, ингибирующим сенсibilизацию TRPV рецепторов [73].

α -суперспираль (coiled-coil) является ещё одним распространённым мотивом в белках TRP семейства. Она может располагаться как на C- так и на N-конце субъединицы и участвует в цитозольных взаимодействиях и связывании полифосфатов [63]. Гидрофобные аминокислоты, равномерно распределённые в линейной последовательности α -спирального домена, опосредуют взаимодействие спиралей друг с другом. Например, α -суперспирали TRPM7 или TRPA1 каналов формируют тетрамеры [63,74], а спираль TRPP2 – тример, который взаимодействует с гликопротеином полицистином-1 [64]. У многих представителей семейства был найден TRP домен, который предположительно участвует в сборке субъединиц или аллостерической регуляции открытия/закрытия канала. Домен располагается сразу за S6 трансмембранным сегментом и состоит из 23-25 аминокислотных остатков, которые формируют α -спираль, располагающуюся параллельно внутренней поверхности мембраны [61].

Присутствие других доменов и мотивов (С-концевого домена, TRP-подобного домена, спирали перед S1), а также сайтов связывания с кальмодулином, липидами, кальцием, инозитол-трифосфатом, фосфоорилазой или гликозилазой, специфично для отдельных каналов, поэтому они могут быть найдены не у всех представителей одного TRP подсемейства.

2.3.3. Локализация TRP каналов и их функции

TRP каналы экспрессируются практически во всех возбудимых и невозбудимых тканях (табл. 1). Некоторые из них распространены повсеместно, другие встречаются только в определённых клетках. Кроме того каналы присутствуют во всех клеточных мембранах, за исключением ядерной оболочки и митохондрий. Например, подсемейство TRPML экспрессируется в эндосомах [75]. Роль TRP каналов в физиологических процессах варьируется от сенсорных функций (например, действие феромонов, трансдукция вкусовых ощущений, ноцицепция и температурная чувствительность) и поддержания гомеостаза (например, Ca^{2+} и Mg^{2+} реабсорбция и осморегуляция) до сокращения мышц и вазомоторного контроля.

Работа TRP каналов часто модулируется их ассоциацией с несенсорными белками (например, ассоциация TRPV4 с PACSIN3 - протеинкиназа C и субстрат киназы в нейронных белках β -, который участвует в синаптическом везикулярном транспорте и регулирует динамин-опосредованный эндоцитоз) [76] и формированием сигнальных комплексов с различными сигнальными белками (например, TRPM4 и изоформы фосфолипазы C, PLC) [77]. Механизм транспорта TRP каналов к местам их внутриклеточной локализации остаётся неизвестным [78].

Известно, что у разных биологических видов TRP каналы обладают различными функциями. Например, TRPV1 человека и грызунов высокоспецифично взаимодействуют с капсаицином, в то время как TRP каналы птиц к нему не чувствительны. Разница также существует и в локализации одних и тех же каналов у разных биологических видов. Например, TRPV3 у мышей и крыс экспрессируется в кератиноцитах [79], а у человека и приматов еще и в чувствительных нейронах [80].

Таблица 1. Представители TRP семейства, участвующие в ноцицепции [81].

Представители TRP	Локализация	Биологическая функция
TRPV1	<p>Ноцицептивные сенсорные нейроны малого/среднего диаметра: спинномозговой, тройничный и блуждающий ганглии (волокна Aδ и C, содержащие нейропептиды - SP, CGRP). Нейроны ядер солитарного пучка и тройничного нерва, центральное серое вещество головного мозга, ядро шва, голубое пятно, гипоталамус, таламус, гиппокамп, мозжечок, черная субстанция, сенсорная кора. Эпителиальные клетки дыхательных путей, обонятельный эпителий, кератиноциты, желудочно-кишечный тракт (печень, энтероциты, желудок и двенадцатиперстная кишка), почки, мочевой пузырь (уротелий), детрузорная мышца, эндотелий сосудов, клетки гладкой мускулатуры, тучные клетки и фибробласты, иммунная система, селезенка и легкие. Вкусовые рецепторные клетки и нервные окончания полости рта, кожа.</p>	<p>Сенсорные нейроны: восприятие боли; высокие температуры (>43°C); термическая гипералгезия при воспалительных состояниях; боль при раке костей; боль в конечностях; боль при цистите мочевого пузыря; гиперчувствительность толстой кишки; выделение нейропептидов (SP и CGRP) - роль в нейрогенном воспалении.</p> <p>Мозг: высвобождение дофамина (крысиная модель болезни Хантингтона); дофаминергические механизмы, связанные с шизофренией и болезнью Паркинсона; синаптическая пластичность ЦНС; нейротоксичность из-за избытка кальция, апоптоза или некроза.</p> <p>Повышенная экспрессия при повреждении тканей, воспалительных заболеваниях пищеварительной и дыхательной системы.</p> <p>Сенсорные нейроны, иннервирующие гладкие мышцы артериол: миогенный спазм (эффект Бейлиса), нейрогенное воспаление в сосудистой стенке.</p> <p>Сердце: кардиопротекция при ишемии (CGRP, NO); сохранение</p>

Представители TRP	Локализация	Биологическая функция
		<p>целостности тканей, подвергнутых воздействию протонов и ферментов, путем увеличения кровотока; вазорелаксация (выработка CGRP); брадикардия, гипотония.</p> <p>Рост волос, рост клеток и дифференцировка; диабет (регуляция глюкозы); ощущение зуда; увеличение энергетического обмена путем стимуляции симпатической нервной системы.</p> <p>Бронхоконстрикция и секреция слизи; гомеостаз обонятельного эпителия; трансдукция вкуса.</p> <p>Терморегуляция - диффузия тепла и термогенез; контроль массы тела.</p>
TRPV2	<p>Спинномозговой, тройничный и блуждающий ганглии (Аβ, Ад-волокна); моторные и симпатические нейроны; серое вещество ядер гипоталамуса, супраоптическое ядро, кора головного мозга; кардиомиоциты, кровеносные сосуды; селезенка; легкие; обонятельный эпителий; кишечник; тучные клетки.</p>	<p>Ноцицептивные и дегенеративные процессы в тканях (например, сердце). Термочувствительность (>53°C).</p> <p>Перенос компонентов спинномозговой жидкости; регулирование поведения при стрессе (тревожность, депрессия, гипертония); преждевременные роды; гомеостаз обонятельного эпителия.</p> <p>Периферическая чувствительность при воспалении.</p>

Представители TRP	Локализация	Биологическая функция
TRPV3	Спинальные ганглии, моторные нейроны, верхние шейные ганглии, чёрная субстанция, гипофиз, скелетные мышцы (человек); волосяные фолликулы, кишечник; носовая полость, ротовая полость - язык и небо, обонятельный эпителий, кератиноциты (человек и мышь).	Функциональный гетероолигомер TRPV1 в спинальных ганглиях; термосенсор - тепловая ноцицепция (>32-39°C); роль в ЦНС (боль); гомеостаз обонятельного эпителия.
TRPV4	Спинальная ганглия и тройничный ганглий, кора головного мозга, таламус, гиппокамп, гипоталамус, мозжечок; эндотелий; почки (собирательная трубочка); гладкая мышечная стенка сосудов; кератиноциты; внутреннее ухо; легкие; селезенка; кератиноциты; скелетные мышцы; обонятельный эпителий.	Осмосенсор гипотонии - роль в функции почек; нейропатическая боль - гипералгезия и аллодиния; температурные ощущения - реакция на тепловые раздражители (>27-35°C); возможно опосредует термическую боль и гипералгезию (низкий уровень экспрессии в сенсорных нейронах); церебральная вазодилатация (косвенная активация кальций-зависимых калиевых каналов); гиперчувствительность дыхательных путей при астме; кистозный фиброз; нарушения слуха; гомеостаз обонятельного эпителия.
TRPM8	Чувствительные нейроны малого и среднего диаметров, А- и С-нервные волокна; возможно, совместная экспрессия с TRPV1; раковые	Восприятие низких температур (<23°C); высокая экспрессия в ипсилатеральных спинальных ганглиях при невропатической боли; гомеостаз обонятельного эпителия;

Представители TRP	Локализация	Биологическая функция
	клетки предстательной железы; обонятельный эпителий; в большом количестве экспрессируется в кровеносных сосудах (аорта крысы, брыжеечная артерия, бедренная артерия, хвостовая артерия).	маркер опухоли при раке предстательной железы; термогенез без тепловой диффузии.
TRPA1	Чувствительные нейроны, С-волокна; совместная экспрессия с TRPV1 в субпопуляции немиелинизированных нервных волокон; постганглионарные симпатические нейроны, моторные нейроны, нейроны кишечного миэнтерического сплетения, уретры, зубной пульпы, волосковых клеток внутреннего уха; фибробласты, энтерохромаффинные клетки, кератиноциты, обонятельный эпителий.	Интегратор ноцицептивных стимулов; универсальный хемосенсор (гипералгезия от горчичного масла); механочувствительность и термочувствительность ($\leq 10^{\circ}\text{C}$) при воспалении; роль в повреждении и воспалении тканей, вызванных окислительным стрессом; гомеостаз обонятельного эпителия; детектирует летучие раздражители в дыхательных путях; кашель, вазодилатация, контроль артериального давления; контроль подвижности желудочно-кишечного тракта; термогенез и ингибирование тепловой диффузии.

2.4. Рецептор TRPA1

2.4.1. История открытия

В 1998 году швейцарские учёные обнаружили гомологичный человеческому анкирину-В (анкирины связывают белки с клеточной мембраной) белок (ANKTM1), который экспрессировался в раковых клетках значительно хуже, чем в здоровых [82]. Только в клетках липосаркомы уровень экспрессии анкирин-подобного белка был выше,

чем в нормальных фибробластах. Гиперэкспрессия рекомбинантного ANKTM1 приводила к гибели как здоровых, так и опухолевых клеток. Используя частично установленную последовательность кДНК анкирин-подобного белка, в базе данных кДНК лёгочных фибробластов человека на хромосоме 8q13 был найден полноразмерный ген ANKTM1. Анализ первичной структуры установил, что на N-конце белка находится 15-18 анкириновых повторов. Ранее этот структурный мотив был найден у цитосклетных белков, транскрипционных факторов и мембранных рецепторов. С-концевая часть ANKTM1 содержит шесть трансмембранных сегментов и напоминает структуру ионного канала. Несмотря на низкую линейную гомологию, анкирин-подобный белок обладал пространственной гомологией с белками TRP семейства [83].

В 2003 году было подтверждено, что ANKTM1 является членом TRP семейства и относится к неселективным катионным каналам. Его выделили в отдельное подсемейство, в котором до сих пор он является единственным представителем. ANKTM1 коэкспрессируется в чувствительных нейронах спинномозговых узлов вместе с TRPV1 каналами [84], а его аминокислотная последовательность на 40 % идентична последовательностями белков TRPV.

В ходе дальнейших исследований было показано, что рецептор TRPA1 (ранее ANKTM1) активируется при низких температурах [84], механическим воздействием [85] и химическими соединениями (например, острые компоненты горчицы, чеснока, корицы [86,87] или эндогенные провоспалительные агенты [11,88]) (рис. 8).

В геноме дрозофилы были найдены три ортолога TRPA1: dTRPA1, Pyrexia, Painless [89–91]. Однако Painless оказался не чувствительным к активаторам человеческого TRPA1 *in vitro* [86,92], а Pyrexia, найденный в геноме *Drosophila melanogaster*, является термореперитором и активируется при температурах выше 40°C. Ортологи dTRPA1 *Drosophila melanogaster*, *Drosophila mojavensis*, *Drosophila virilis*, и agTRPA1 малярийного комара *Anopheles gambiae* активируются модуляторами TRPA1, причём их механизм взаимодействия аналогичен действию лигандов на человеческий рецептор. Кроме того, филогенетические исследования доказали, что TRPA1 рецепторы позвоночных и беспозвоночных имеют общего предка. Подобная консервативность свидетельствует о том, что рецептор служит эффективным детектором химических раздражителей у животных на протяжении 500 млн. лет эволюции [93]. Сравнительный анализ TRPA1 рецепторов человека, обезьяны, мыши и крысы установил, что все они

имеют ряд физиологических отличий, которые тем больше, чем больше различаются их аминокислотные последовательности. Идентичность рецепторов приматов и грызунов составляет 79%, в то время как гомология крысиных и мышиных TRPA1, так же как человеческих и обезьяньих, составляет 97%. Кроме того, наблюдается видовая специфичность действия некоторых модуляторов рецептора, что имеет большое значение при поиске и изучении TRPA1-активных препаратов для лечения различных болезней человека [94].

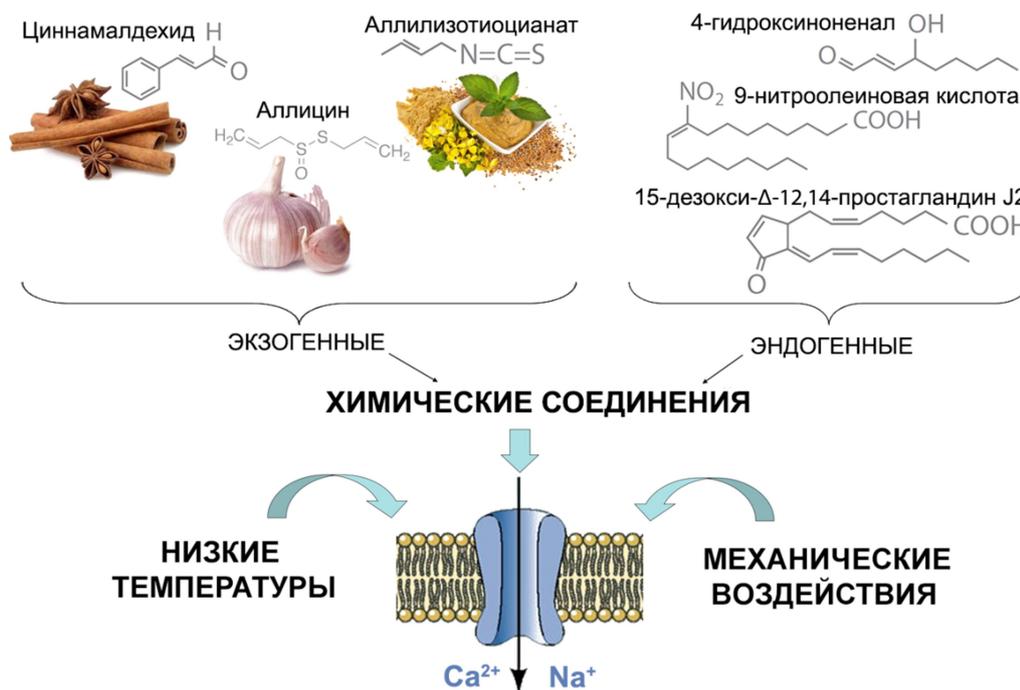


Рисунок 8. Стимулы, активирующие рецептор TRPA1 (термочувствительность и механочувствительность при ноцицепции).

2.4.2. Структура рецептора TRPA1

Структура полноразмерного человеческого рецептора TRPA1 в присутствии фармакофоров определена методом одностичной криоэлектронной микроскопии с разрешением 4 Å [63]. Внутриклеточные N- и C-конец белка составляют ~80% молекулярной массы субъединицы. Трансмембранная часть TRPA1 белка состоит из шести α-спиралей (S1 – S6) и поровой петли между сегментами S5 и S6. Гомотетрамёрный рецептор формируется за счёт обмена между четырьмя субъединицами одинаковых структурных элементов. Свободные N- и C- концы

содержат домены, мотивы и различные сайты связывания, участвующие в сборке и стабилизации рецептора, а также в модуляции его активности (рис. 9).

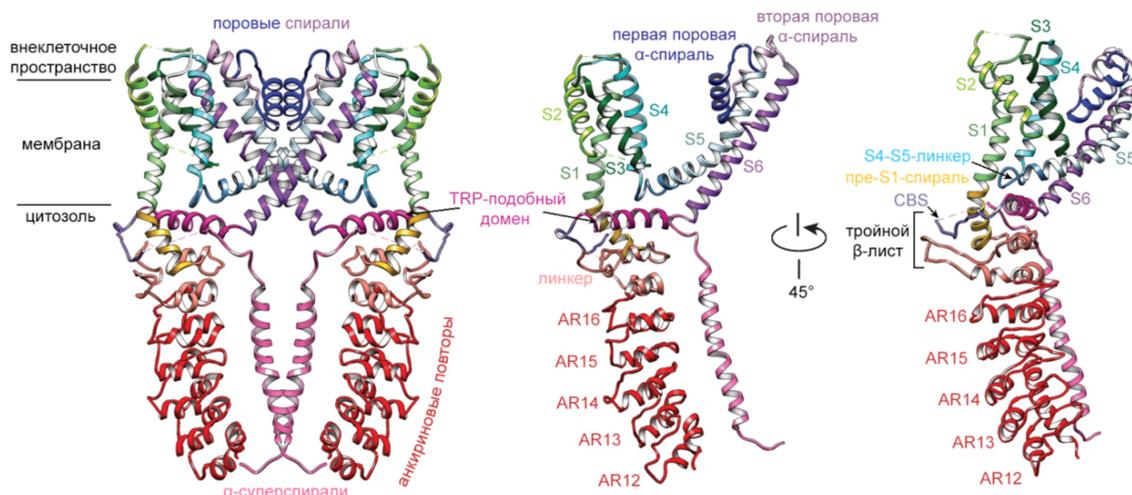


Рисунок 9. Ленточная структура субъединицы TRPA1 [63]. На рисунке обозначены шесть трансмембранных α -спиралей (S1 - S6), две поровые α -спирали, S4-S5-линкер, пре-S1-спираль, TRP-подобный домен, α -суперспирали, калмодулин-связывающий сайт (CBS), «стебель» анкиринового домена - повторы с 12 по 16 (AR), три β -тяжа, формирующие тройной β -лист, и линкер (α -спираль – два β -тяжа – α -спираль) между AR и пре-S1-спиралью.

α -суперспирали на С-концах субъединиц формируют тетрамерный домен, который располагается под поровой областью. Обычно такая структура стабилизируется гидрофобными аминокислотными остатками, однако в случае TRPA1 спирали образуют водородные связи между глутаминами (Gln 1061). Дестабилизация структуры также происходит за счёт взаимодействия остатков глутамина, но в другом положении (Gln 1047) (рис. 10 А). Растворимые пирофосфаты и трифосфаты способны стабилизировать белковую молекулу [95] и способствовать активации TRPA1 агонистами [96]. Связывание полифосфата с Lys 1046 и Arg 1050 на поверхности одной спирали, а также Lys 1048 и Lys 1052 на соседней спирали конкурирует с дестабилизирующим взаимодействием остатков глутамина Gln 1047.

Область, соединяющая анкириновый домен и первый трансмембранный сегмент, является центром аллостерической регуляции TRPA1 рецептора и состоит из линкера и пре-S1-спирали. Линкер включает в себя две α -спирали соединённые двумя антипараллельными β -тяжами. В структуре TRPA1 отсутствует TRP мотив, но есть его

топологический аналог – α -спиральный TRP-подобный домен – располагающийся за S6 трансмембранным сегментом параллельно внутренней поверхности мембраны (рис. 10 Б). Линкер и TRP-подобный домен взаимодействуют посредством гидрофобных взаимодействий между их α -спиралями и за счёт формирования тройного β -листа, который состоит из двух β -тяжей линкера и β -цепи калмодулин-связывающего сайта (CBS) (рис. 9), располагающегося за TRP-подобным доменом. В свою очередь тройной β -лист взаимодействует с утопленной в мембрану короткой α -спиралью, которая связывает TRP-подобный домен с α -суперспиралью на С-конце и отвечает за взаимодействие с фосфолипидами, модулирующими активность рецептора [97]. Кроме того TRP-подобный домен посредством гидрофобных взаимодействий связан с пре-S1-спиралью и S4-S5-линкером, и, следовательно, участвует в аллостерической модуляции TRPA1 [98].

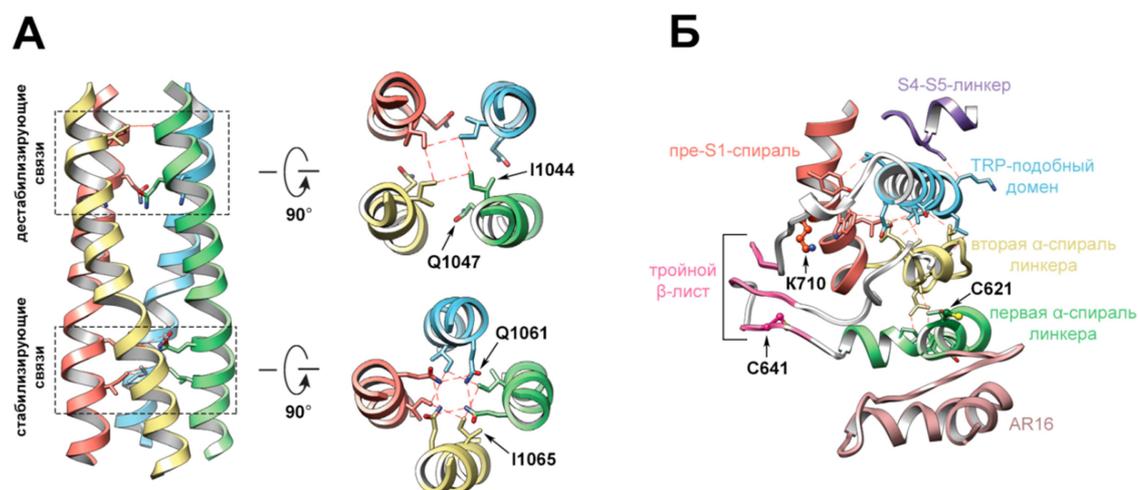


Рисунок 10. А. С-концевые α -суперспирали четырех субъединиц TRPA1 взаимодействуют за счёт стабилизирующих (нижние Q1061) и дестабилизирующих (верхние Q1047) водородных связей между глутаминами. Карман связывания полифосфатов находится рядом с дестабилизирующими Q1047, поэтому полифосфаты стабилизируют TRPA1 [63]. Б. Пространственное расположение и взаимодействие важных структурных доменов TRPA1: TRP-подобного домена, пре-S1-спирали, S4-S5-линкера, тройной β -лист, состоящего из трех β -тяжей (розовые), анкиринового домена (AR16) и линкера (α -спираль – два β -тяжа – α -спираль) между AR16 и пре-S1-спиралью. Cys 621, Cys 641, Lys 710 – аминокислотные остатки, с которыми связываются электрофильные модуляторы в человеческом TRPA1. [63]

На активность рецептора влияет концентрация внутриклеточного кальция: низкие концентрации потенцируют, а высокие инактивируют TRPA1. Этот эффект зависит от наличия в клетке Ca^{2+} -связывающего мессенджера, двудоменного белка калмодулина. Посредством своего С-домена калмодулин связывается с CBS рецептора в Ca^{2+} -зависимой манере и увеличивает чувствительность TRPA1 к катионам кальция [99].

Аминокислотные остатки человеческого TRPA1, участвующие в связывании электрофильных модуляторов рецептора, располагаются между анкириновым доменом и S1 трансмембранным сегментом: первая линкерная спираль (Cys 621); первая цепь тройного β -листа (Cys 641); петля, соединяющая β -тяжи со второй линкерной спиралью (Cys 665); пре-S1-спираль (Lys 710) [17]. В мышинном рецепторе за связывание с электрофильными соединениями отвечают остатки Cys 415, Cys 422, Cys 622, Lys 712 [16,100], а в крысином TRPA1 остатки Cys 619, Cys 639, Cys 663, Lys 708 [101]. Все эти аминокислотные остатки пространственно-доступны и хорошо изучены. При связывании с ними сигнала о конформационных изменениях передаётся на TRP-подобный домен, в результате чего, например, ослабевают стерические препятствия и/или электростатическое отталкивание, вызванные химической модификацией рецептора. Считается, что в связывании электрофильных модуляторов также участвуют дополнительные аминокислотные остатки на N-конце (Cys 421 в мышинном TRPA1) и в трансмембранной области рецептора (Ser 943 и Ile 946 в человеческом TRPA1) [100,102,103]. Кроме того существует предположение, что трансмембранные сегменты способны взаимодействовать с липидным окружением и липофильными электрофилами за счёт модификации Cys 727, Lys 771 и Cys 834.

Рецептор TRPA1 характеризуется наличием длинного анкиринового домена на N-конце, функции которого до конца не ясны. TRPA1 содержит самое большое количество анкириновых повторов (AR) среди TRP белков позвоночных: от 14 до 18 штук [104]. N-конец рецептора состоит из двух областей: выпуклого «стебля» (~5 AR) и гибкого «полумесяца» (~11 AR) (рис. 11). В анкириновом домене были найдены области, которые отвечают за термическую и химическую чувствительность [105], что свидетельствует о предполагаемом взаимодействии домена с поровой областью. Сигнал от анкириновых повторов поступает на линкер посредством гидрофобных и ионных взаимодействий между ними и через TRP-подобный домен передается поре. Кроме того взаимодействия между боковыми цепями AR12 и двойной α -спиралью, а также AR16 и

первой линкерной спиралью стабилизируют «стебель» и способствуют направленной сборке рецептора. Активность TRPA1 млекопитающих может модулироваться рецепторами, сопряжёнными с фосфолипазой C [106], либо за счёт увеличения концентрации Ca^{2+} в цитозоле, либо прямого взаимодействия анкиринового домена с белком $G\beta\gamma$.

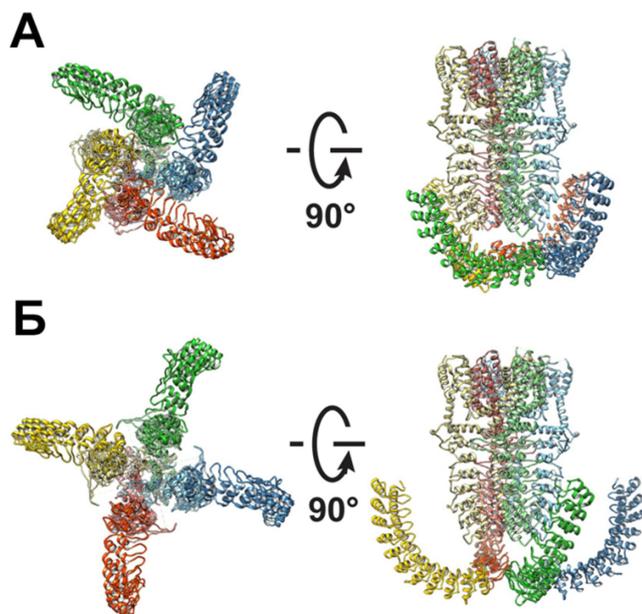


Рисунок 11. Анкириновый домен состоит из «стебля» (~5 AR) и «полумесяца» (~11 AR). Последний окружает рецептор в цитозоле и формирует либо (А) структуру напоминающую пропеллер (наиболее вероятная конформация), или (Б) независимые крылья. [63]

Структура поровой области рецептора TRPA1 похожа на TRPV1, но имеет некоторые отличительные особенности. Р-петля между трансмембранными сегментами S5 и S6 содержит две α -спирали (рис. 9), одна из которых заряжена отрицательно, что, возможно, позволяет притягивать к поре катионы и отталкивать анионы [107], а структура внешней поровой области TRPA1 напоминает выпуклую форму K_v каналов [108]. Верхние поровые ворота TRPA1 в диаметре достигают 7.0 Å и формируются остатками Asp 915. Поскольку диаметр ворот больше 6.0 Å, то через них могут проходить частично дегидратированные ионы кальция [109,110]. Нижние поровые ворота сформированы остатками Ile 957 и Val 961, которые за счёт гидрофобных взаимодействий в самом узком месте образуют воронку с диаметром 6.0 Å. Размеры поровых ворот означают, что либо верхние ворота находятся в частично открытом состоянии, либо они вообще не участвуют в функционировании рецептора (рис. 12 А). Недавние исследования TRPA1 показали, что между трансмембранными сегментами S5, S6 и первой поровой спиралью находится карман с семью аминокислотными остатками:

Ser 873, Thr 874, Leu 881, Phe 909, Phe 944, Val 948 и Ile 950 -, с которыми связывается антагонист A-967079 [111,112]. Исследование другого TRPA1 антагониста, HC-030031, показало, что он не связывается с рецептором в этом кармане, и место его взаимодействия ещё точно не установлено [63].

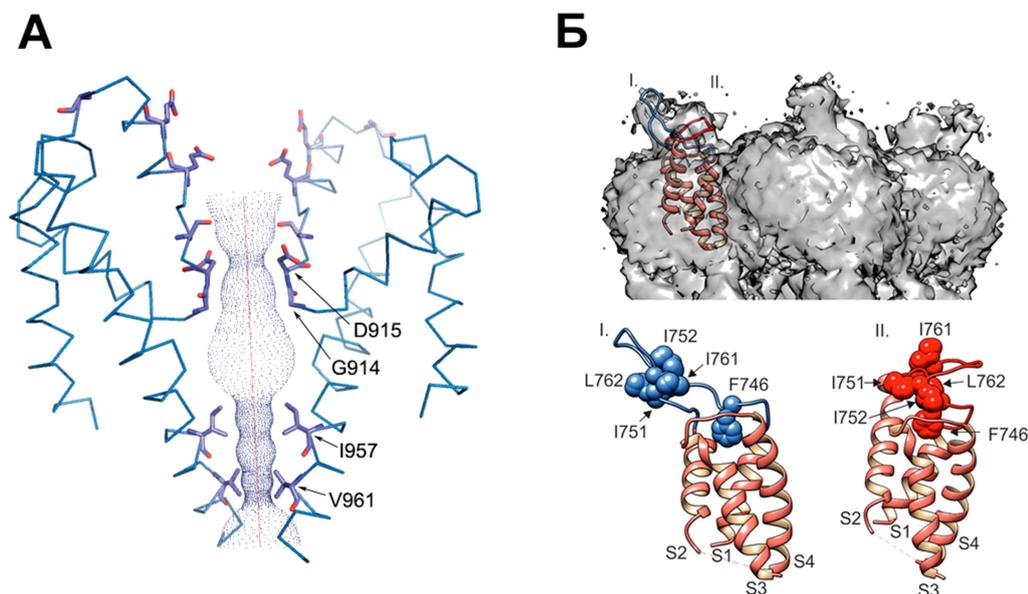


Рисунок 12. А. Структура поровой области рецептора TRPA1: Asp 915 формирует верхние ворота диаметром 7.0 Å, Ile 957 и Val 961 формируют нижние ворота диаметром 6.0 Å. [63] **Б.** S1-S2-линкер (N722 - A971) может принимать две конформации. Первая конформация (синяя) стабилизирована гидрофобными аминокислотными остатками и имеет форму шпильки. Вторая конформация (красная) образует гидрофобные связи с поверхностью рецептора. Фенилаланин F746 стабильно располагается в средней части линкерного домена. [113]

Ещё одной важной структурной единицей рецептора является внеклеточный линкер между трансмембранными сегментами S1 и S2 (рис. 12 Б). Аминокислотная последовательность в этой области сильно различается у разных биологических видов и, возможно, обладает уникальными биологическими функциями. В человеческом TRPA1 внеклеточный регуляторный линкер, скорее всего, специфически взаимодействует с поверхностью рецептора и стабилизирует открытый канал при активации из гиперполяризованного состояния [113]. В потенциал-зависимой активации рецептора участвуют аминокислотные остатки I 751 и I 752. Кроме того, на пространственную

структуру линкера влияют конформационные изменения нижних ворот поры, следовательно, он может участвовать в регуляции активности TRPA1 [113].

2.4.3. Физиологические функции рецептора TRPA1

Рецептор TRPA1 является одним из участников пути передачи болевых сигналов при воспалении и нейропатиях, наряду с G-белок связанными рецепторами, рецепторами тирозинкиназы и TRPV1 (рис. 13). TRPA1 играет важную роль хемосенсора, а также участвует в восприятии термических и механических воздействий.

2.4.3.1. Хемочувствительность

TRPA1 активируется под действием экзогенных электрофильных раздражителей, к которым относятся аллилизотиоцианат (АИТС) из васаби, циннамальдегид (коричный альдегид) из экстракта корицы [86,87], аллицин из экстракта чеснока [114,115], акролеин из выхлопов автомобилей [20], 2-(2-хлорбензилиден)малонитрил (слезоточивый газ) [10] и другие химические раздражители (рис. 14). Все эти вещества ковалентно связываются с тремя цистеинами и лизином в N-концевой области рецептора (рис. 10 Б). Другие аминокислотные остатки также могут участвовать в регуляции активности рецептора и быть мишенями электрофильных модуляторов [17,100,116,117]. В результате замены функционально важных остатков цистеина и лизина получаются нечувствительные к электрофильным агонистам мутанты [16,103,116], однако, чувствительность к неэлектрофильным активаторам сохраняется.

Рецептор может активироваться под действием эндогенных электрофильных агонистов, к которым относится множество провоспалительных агентов: 4-гидрокси-2-ноненал (4-HNE) [118,119], 4-оксононенал (4-ONE) [120], 15-дезоксидельта^{12,14}-простагландин J2 [120,121], 9-нитроолеиновая кислота (9-OA-NO₂) [122], ненасыщенные жирные кислоты [123] и H₂O₂ [120] (рис. 14). Все эти вещества выделяются в организме в результате окислительного стресса и воспаления.

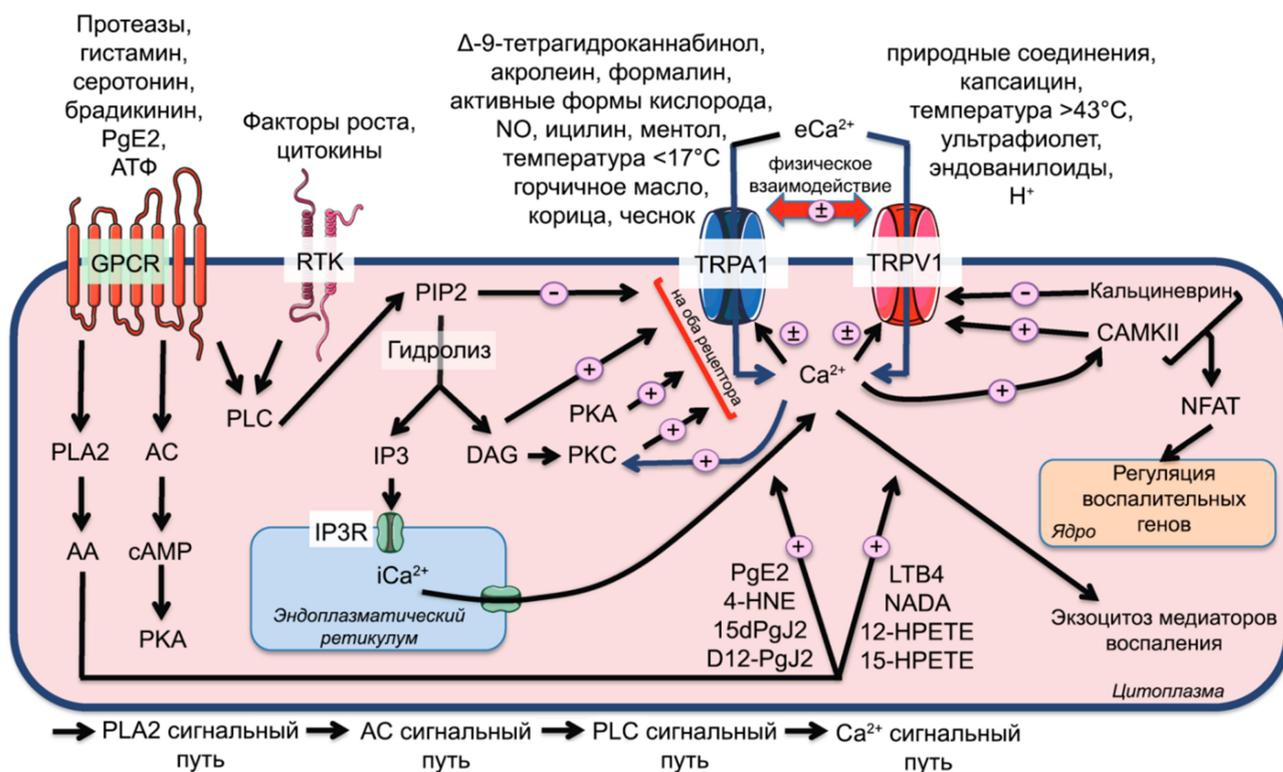


Рисунок 13. Регуляция внутриклеточных сигнальных путей G-белок связанного рецептора (GPCR), рецептора тирозинкиназы (RTK) и Ca^{2+} посредством активации и сенсibilизации TRPV1 и TRPA1. Активация GPCR и RTK стимулирует фосфолипазу C (PLC), что приводит к гидролизу фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата (PIP2), который ингибирует TRP рецепторы, с образованием 1,4,5-трифосфата (IP3) и диацилглицерина (DAG), а также притоку Ca^{2+} через TRPV1 и TRPA1. DAG может непосредственно активировать TRP-каналы, так и протеинкиназу C (PKC), которая повышает чувствительность обоих каналов. IP3 способствует высвобождению Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума и увеличению концентрации внутриклеточного кальция ($i\text{Ca}^{2+}$). GPCR также могут активировать сигнальные пути фосфолипазы A2 (PLA2) и аденилатциклазы (AC), которые приводят к стимуляции протеинкиназы A (PKA) и образованию метаболитов и производных арахидоновой кислоты (AA). PKA сенсibilизируют TRP-каналы, тогда как метаболиты и производные AA непосредственно их активируют. TRPV1 и TRPA1 могут прямо или косвенно регулировать активность друг друга путем прямого взаимодействия или посредством $i\text{Ca}^{2+}$ концентрации, приводя к перекрестной сенсibilизации/десенсibilизации. Повышение уровня $i\text{Ca}^{2+}$ вызывает экзоцитоз медиаторов воспаления и стимулирует Ca^{2+} /калмодулин-зависимую киназу II (CAMKII) и кальциневрин, которые сенсibilизируют и десенсibilизируют TRPV1, соответственно. CAMKII и кальциневрин участвуют в регуляции воспалительных генов посредством транслокации NFAT в ядро. [124]

Метилглиоксаль - метаболит, который накапливается в клетках при диабете [14,15] и хронической болезни почек [15] - способен непосредственно активировать TRPA1, вызывая болевую нейропатию у мышей (рис. 14) [16,17]. Механизм его взаимодействия с рецептором отличается от действия других агонистов. Помимо того, что метилглиоксаль ковалентно связывается с N-концевым лизином, он индуцирует образование дополнительных дисульфидных связей на N-конце рецептора [17]. Другим примером нестандартной действия на TRPA1 служит вызывающий головную боль умбеллулон (монотерпеновый кетон из листьев дерева *Umbellularia californica*), который активирует TRPA1 ковалентно связываясь с N-концевыми цистеинами и дополнительно нековалентно взаимодействуя с рецептором (рис. 14) [125]. То, что умбеллулон вызывает головную боль, доказывает участие TRPA1 в развитии мигрени [126]. Интересным эффектом обладает электрофильный эндогенный активатор TRPA1 15-деокси- $\Delta^{12,14}$ -простагландин J2. При введении в лапы мышей он стимулирует болевое поведение, за которым следует антиноцицептивный или обезболивающий эффект [127].

Многие провоспалительные агенты регулирующие активность TRPA1 действуют не на TRPA1, а на рецепторы, сопряжённые с G-белками (GPCR): рецептор брадикинина (BK), рецепторы активируемые протеиназами (PAR2, RTK), рецептор желчной кислоты (TGR5), рецептор тимусного стромального лимфопоэтина (TSLP), рецепторы из семейства Mrg (MrgprA3 и MrgprC11) [86,106,128–131]. Связывание медиаторов с GPCR приводит к активации TRPA1 и/или сенсibilизации рецептора (рис. 13).

Газотрансмиттеры H_2S [132] и NO [133] сенсibilизируют ноцицепторы, взаимодействуя с TRPA1. Однако концентрации при которых они активируют рецептор значительно выше физиологических. Вместе с тем нитроксил анион (NO^-), который может быть получен посредством взаимодействия H_2S и NO , активирует TRPA1 в физиологических концентрациях и возможно участвует в контроле кровотока [134].

Рецептор напрямую активируется гипоксии и гипероксии [135]. Таким образом, TRPA1 участвует в ответе организма на избыток и недостаток кислорода.

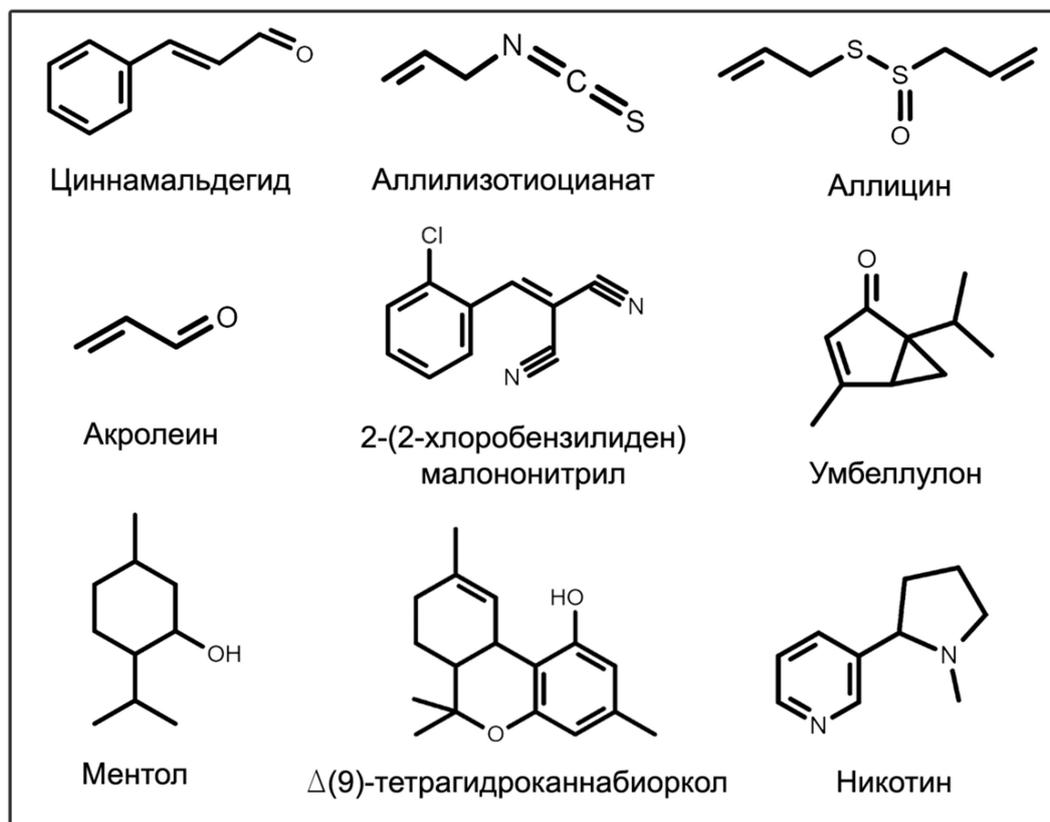
Процесс внеклеточного закисления или ацидоза, происходящий при воспалении, росте раковых клеток и ишемии, сопровождается сенсibilизацией ноцицепторов. Человеческий TRPA1 способен активироваться под действием изменяющегося pH (< 7) окружающей среды, в отличие от ортологов [136]. Аминокислотные остатки, воспринимающие внеклеточное закисление, находятся на N-конце (Cys 621) и в шестом

трансмембранном сегменте (Val 942 и Ser 943) [133,136]. Вместе с тем Cys 621 присутствует также в рецепторах грызунов и обезьян, но их TRPA1 не чувствительны к внеклеточному закислению [136]. Рецепторы грызунов воспринимают изменения кислотно-основных свойств среды внутри клетки [137,138]. Зависимость активации TRPA1 от pH имеет U-образную форму. Мутация двух N-концевых цистеинов (Cys 422 и Cys 622) делает рецептор нечувствительным к защелачиванию (алкалозу) цитозоля [139]. Поскольку активация TRPA1 под действием изменяющихся кислотно-основных свойств среды сохраняется в методе *inside-out patch clamp*, то участие вторичных мессенджеров в процессе восприятия pH исключено [138,139]. Так как рецептор участвует в регуляции уровня кислорода и pH в организме, то он относится к потенциальным медиаторам ишемической боли, а также защитных и адаптивных реакций индуцируемых ишемией.

Внутриклеточный кальций способен как непосредственно активировать TRPA1, так и потенцировать действие агонистов [140,141]. В некоторых случаях присутствие Ca^{2+} в цитозоле является необходимым условием активации рецептора. Например, при взаимодействии с аллицином концентрация кальция в клетке должна быть выше нормы [142]. Однако при концентрациях Ca^{2+} выше, чем требуется для активации и потенцирования, происходит инактивация рецептора [140]. Чувствительность TRPA1 к катионам кальция обусловлена связыванием белка калмодулина с калмодулин-связывающим доменом рецептора в Ca^{2+} -зависимой манере [99].

Способность TRPA1 взаимодействовать с потенциально опасными электрофильными соединениями и окислительными агентами согласуется с ноцицептивной функцией рецептора, в то время как действие неэлектрофильных соединений на TRPA1 не имеет физиологических объяснений [143–146]. Известно, что электрофильные метаболиты парацетамола (N-ацетил-п-бензохинонимин и п-бензохинон) и неэлектрофильный не психотропный каннабиноид Δ^9 -тетрагидроканнабиол, активирующие TRPA1, оказывают обезболивающее действие *in vivo* за счёт уменьшения возбудимости чувствительных нейронов в спинном мозге (рис. 14) [147]. Нестероидные противовоспалительные средства [148,149] тоже активируют TRPA1, что может приводить к болевым ощущениям при внутримышечном введении.

Химические раздражители



Воспалительные агенты и метаболиты

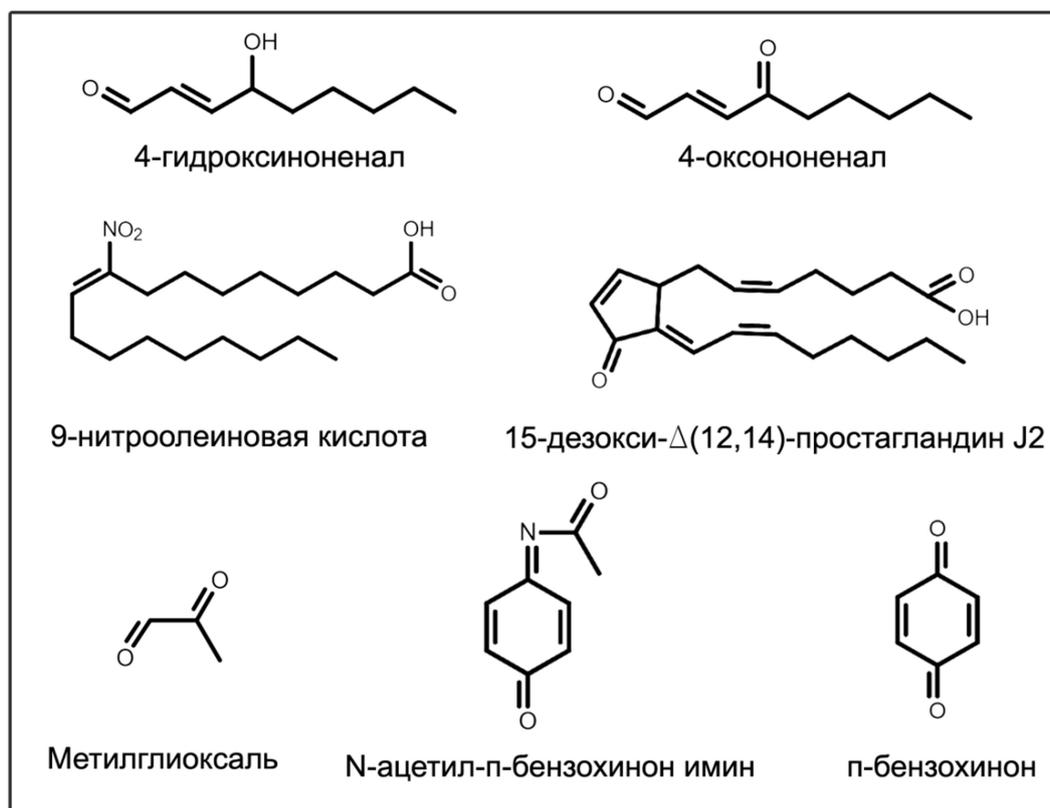


Рисунок 14. Химические соединения, активирующие рецептор TRPA1.

С помощью метода масс-спектрометрии было установлено, что электрофильные активаторы ковалентно связываются с рецептором [100,117,150]. Это взаимодействие

подтверждает роль TRPA1 в качестве хемосенсора. Неэлектрофильные модуляторы, ментол и Δ^9 -тетрагидроканнабиол, как было показано с помощью мутагенеза, химерных конструкций и patch в изолированных мембранах, также непосредственно действуют на рецептор, но не образуют ковалентных связей [96,151,152].

Некоторые активаторы, как электрофильные, так и неэлектрофильные, обладают бимодальным действием на рецептор: активируют его при низких концентрациях и десенсибилизируют при высоких. Например, коричный альдегид, ментол, никотин и другие (рис. 14) [153–155]. Многие агонисты TRPA1 (например, никотин) способны взаимодействовать с другими TRP каналами и мембранными рецепторами, которые участвуют в TRPA1-опосредованной сигнализации [145,156]. Список известных природных блокаторов рецептора TRPA1 очень мал [157–160]. Дальнейшие исследования механизмов активации рецептора, а также причин бимодального действия некоторых модуляторов позволят лучше изучить функции TRPA1 и найти новые модуляторы с уникальными физиологическими свойствами.

2.4.3.2. Термочувствительность

Первоначально TRPA1 был охарактеризован, как рецептор способный воспринимать потенциально опасные для организма низкие температуры [84]. Ряд исследований подтвердил, что рецептор активируется при температурах ниже 17°C [86,161–163], в то время как другие учёные оспаривали это утверждение [87,105,141]. Изучение влияния низких температур на мышей с нокаутным TRPA1 геном дало неоднозначные результаты. В одних исследованиях восприятие холода у нокаутных мышей не меняется ни в тесте холодной пластины, ни при охлаждении за счёт испарения ацетона [20,164]. Другие утверждали, что чувствительность к холоду снижается только у особей женского пола [165]. Третьи описывали изменение в поведении мышей при сохранении нормальной температурной чувствительности [162]. В некоторых исследованиях у TRPA1-нокаутных мышей наблюдался более высокий порог тепловой чувствительности [166]. Последние утверждали, что изменяется не чувствительность к холоду, а увеличивается эффект агониста АИТС при низких температурах [161]. Исследования единичного рецептора показали, что при температуре ниже комнатной вероятность открытия TRPA1 увеличивается и не зависит от

присутствия ионов Ca^{2+} [162,163]. Однако, влияние катионов кальция *in vivo* на TRPA1-опосредованный процесс восприятия холода ни в коем случае не исключается. Исследование мышей с нокаутным TRPA1 или TRPM8 генами показали, что только нокаут последнего приводит к изменению восприятия холода. Следовательно, TRPM8 является основным сенсором холода, который участвует в развитии нормальных поведенческих реакций. Реакции на холод TRPA1/TRPM8-нокаутных мышей (генотип TRPA1^{-/-} / TRPM8^{-/-}) не отличались от мышей с TRPM8 нокаутным геном [164].

Фармакологические исследования модуляторов TRPA1 *in vivo* на грызунах подтвердили способность рецептора активироваться под действием низких температур. Ингибирование TRPA1 синтетическими антагонистами снижало вызванную воспалением холодовую аллодинию, периферическую нейропатию [161,167,168], и термическую гиперчувствительность в модели нейропатической боли, индуцированной химиотерапией [169]. Вдобавок, TRPA1-специфичные антисмысловые олигонуклеотиды уменьшали холодовую аллодинию в моделях воспалительной и нейропатической боли [11].

Дальнейшие исследования выявили отличия в термочувствительности TRPA1 различных видов млекопитающих. К примеру, рецепторы беспозвоночных и древних позвоночных способны активироваться под действием умеренно высоких температур, в отличие от их ортологов [170]. Первое сравнительное исследование в гетерологической системе экспрессии крысиного, мышинного, человеческого и обезьяньего TRPA1 показало, что только рецепторы грызунов чувствительны к холоду (активация ~40% относительно эффекта АИТС) [170]. Восприятие холода крысиными чувствительными нейронами, экспрессирующими TRPA1, зависит от их анатомического происхождения [171] – возможно, окружающая среда клетки и окислительно-восстановительные свойства цитозоля изменяют конформацию N-концевой области белка, влияя, таким образом, на активацию рецептора холодом. Однако электрофизиологические исследования в липидном бислое человеческого TRPA1 без N-концевого анкиринового домена продемонстрировали способность рецептора активироваться под действием низких температур, а также электрофильных и неэлектрофильных агонистов (102). Более того, у некоторых людей, страдающих от нейропатической боли, наблюдается парадоксальное чувство тепла в ответ на воздействие холода, обусловленное мутацией E179K в четвёртом анкириновом домене рецептора [173]. Вероятнее всего, замена

влияет на способность TRPA1 взаимодействовать с другими белками или препятствует олигомеризации мономеров рецептора [174]. Таким образом, TRPA1, как у грызунов, так и у человека, при определённых условиях чувствителен к холоду, но механизм его активации не известен.

Подводя итоги, можно сделать вывод, что, несмотря на то, что TRPA1 не участвует в восприятии низких температур нейронами (TRPM8 - основной сенсор холода), при воспалительных процессах рецептор, активируясь под действием эндогенных агонистов, участвует в холодовой аллодинии (повышенной чувствительности к низким температурам).

Рецептор TRPA1 является основным компонентом системы трансдукции ноцицептивных сигналов у планарий *Schmidtea mediterranea*. В то время как дрозофилы с мутацией в гене, кодирующем TRPA1, не способны избегать вредных термических воздействий. Было обнаружено, что человеческий TRPA1 и рецептор планарий могут восстанавливать температурную чувствительность у TRPA1-мутантных мух, хотя ни один из этих каналов напрямую не активируется при нагревании [175]. Предполагается, что функция TRPA1 в ноцицептивном тепловом зондировании у *Schmidtea* и *Drosophila* выходит за рамки чувствительности канонического рецептора: в ответ на потенциально опасное тепловое воздействие быстро вырабатываются H_2O_2 и/или активные формы кислорода, которые способствуют активации TRPA1, опосредуя защитные реакции. Температурный диапазон, который, приводит к повреждению ткани у дрозофилы (~35-40°C), отличается от диапазона планарии ($\geq 30^\circ C$) и человека ($\geq 45^\circ C$). Однако у трансгенных мутантных мух восстанавливается способность избегать опасные термические воздействия в диапазоне свойственном реципиенту (дрозофилы), а не донору канала (планарии или человека). Это эффект можно объяснить тем, что температурный диапазон, который вызывает повреждение тканей (и, следовательно, производство H_2O_2 и/или активные формы кислорода), определяется теплостойкостью тканей реципиента.

Таким образом, первые билатеральные организмы обладали полимодальной (термической-механической-химической) ноцицептивной системой, которая основывалась на активации TRPA1 посредством H_2O_2 и/или активных форм кислорода. Эта функция сохранилась у современных организмов и может являться ключевой для

активации TRPA1 низкими или высокими температурами у различных видов животных [176].

Исследование очищенного человеческого TRPA1, встроенного в липидный бислой, показало, что канал обладает U-образной термочувствительностью при измерении величин ионных токов, опосредованных рецептором, в температурном диапазоне от 15°C до 40°C. Минимальное значение величины тока наблюдалось при 22°C, а максимальное при 35°C. С помощью метода patch clamp было показано, что при 30°C, токи, опосредованные TRPA1, наблюдаются как при положительном (+60 мВ), так и отрицательном (-60 мВ) потенциалах, и антагонисты рецептора могут их ингибировать.

Изменение окислительно-восстановительных свойств дисульфидных связей в канале с помощью восстанавливающих (DTT – дитиотреитол; и TCEP - трис(2-карбоксиэтил) фосфин) и окисляющих (H₂O₂) агентов влияет на термочувствительность TRPA1. TCEP ингибировал активацию канала при 15°C и 30°C, в то время как H₂O₂ снижал активность рецептора при 30°C, и увеличивал ионные токи, опосредованные TRPA1, при 15°C. Кроме того, восстанавливающие агенты блокировали чувствительность к низким температурам у мутантного TRPA1, лишённого анкириновых повторов, что означает наличие термочувствительных сайтов вне N-концевого домена. Полученные данные указывают на наличие различных конформационных состояний или воротных механизмов, лежащих в основе чувствительности к теплу и холоду.

При тестировании на клеточной линии HEK293t, экспрессирующей TRPA1, не наблюдалось активации рецептора под воздействием низких температур. Однако лиганды рецептора оказались способны влиять на термочувствительность TRPA1. Например, после прединкубации TRPA1 с акролеином под воздействием низких температур появлялись ионные токи, опосредованные рецептором. В отличие от холода, температуры от 25°C до 35°C приводили к активации TRPA1, которая усиливалась в присутствии акролеина и карвакрола. Кроме того, при тестировании на клетках мышинной трахеи наблюдали устойчивое TRPA1-зависимое высвобождение CGRP при нагревании до 36°C в условиях окислительного стресса. [177]

Таким образом, чувствительность ноцицепторов к теплу отчасти может зависеть от TRPA1 и его окислительно-восстановительных свойств, давая основание считать

рецептор датчиком тепла у млекопитающих, также как и у остальных живых организмов.

2.4.3.3. *Механочувствительность*

Поскольку большой N-концевой анкириновый домен TRPA1 формирует структуру похожую на изогнутую полумесяцем пружину [63,72,178], и рецептор экспрессируется в клетках внутреннего уха [85], а TRP каналы беспозвоночных являются механотрансдукторами [49,179], было выдвинуто предположение, что TRPA1 отвечает за механочувствительность. Хотя у TRPA1-нокаутных мышей не обнаружено дефектов слуха [20,165], антагонисты TRPA1 уменьшали потенциал действия, вызванный механическими стимулами, в «С» ноцицепторах кожи [180,181] и чувствительных нейронах кишечника [182], снижали механическую гиперчувствительность при воспалении (вызванном полным адьювантом Фрейнда) [183], и ослабляли ответ чувствительных нейронов на интенсивное механическое воздействие в норме и при травме или остеоартрите [184].

Стимулируемый механическим воздействием входящий ток имеет две компоненты: медленную и быструю. Антагонисты TRPA1 полностью блокировали медленную компоненту в DRG нейронах, полученных от мышей дикого типа, а в чувствительных нейронах TRPA1-нокаутных мышей наблюдалось уменьшение амплитуды быстрой компоненты тока на 60% [185]. Кроме того, на клетках HEK293, экспрессирующих TRPA1, было показано, что рецептор способен активироваться при сжатии или искривлении мембраны [186,187]. Например, липополисахарид (LPS), мембранный гликолипид грамотрицательных бактерий, активирует TRPA1 [188], внося возмущение в липидный бислой. Более того, LPS, выделенные из мембран *E. coli*, *S. marcescens* и *N. meningitidis*, в разной степени влияют на TRPA1, таким образом активация рецептора зависит от формы липидной части LPS, встраиваемой в мембрану. Однако воздействие на клеточную мембрану активирует рецептор менее эффективно, чем электрофильные агонисты.

Неоднозначные результаты были получены при исследовании поведения TRPA1-нокаутных мышей в условиях интенсивного механического воздействия. По одним данным интенсивность острой механической ноцицептивной боли значительно

уменьшалась [165,189,190], по другим оставалась неизменной [20,191]. Кроме того в эпидермисе нокаутных мышей наблюдается снижение плотности нервных волокон по сравнению с диким типом [16], поэтому некоторые ранее полученные результаты *in vivo* требуют дополнительной проверки.

Таким образом, есть все основания полагать, что рецептор TRPA1 участвует в механотрансдукции, а также механической аллодинии и гиперчувствительности, но не относится к ключевым механочувствительным рецепторам.

2.5. Патофизиологические процессы с участием TRPA1

Рецептор TRPA1 экспрессируется в блуждающих и чувствительных нейронах, которые иннервируют дыхательную систему, он участвует в воспалительных процессах, протекающих в лёгких, бронхах, трахеи и гортани, а также является хемосенсором к различным летучим раздражителям [9,10,118,192]. Верхние и нижние дыхательные пути содержат большое количество «С» волокон и Аδ ноцицепторов [193–195], стимуляция которых приводит к выбросу воспалительных нейропептидов (SP, CGRP, нейрокинин А) [196], вызывающих бронхоспазмы, релаксацию гладкой мускулатуры в стенках кровеносных сосудов (вазодилатацию), перемещение иммунных клеток в область воспаления (экстравазацию) и мобилизацию воспалительного ответа [197]. Кашель, повышенная секреция слизи и поверхностное дыхание – защитные процессы, которые ограничивают воздействие раздражителей и очищают дыхательную систему. Длительный воспалительный процесс, вызванный повторным воздействием раздражителей или наследственными заболеваниями (например, муковисцидозом), может способствовать развитию хронического кашля, хронической обструктивной болезни лёгких, астмы, синдрома реактивной дисфункции дыхательных путей.

Многие летучие раздражители (акролеин, озон, изотиоцианаты, слезоточивый газ, хлорин) вызывающие болевые ощущения, непосредственно активируют TRPA1 [8–10] и стимулируют запуск защитных реакций организма. Образование эндогенных лигандов TRPA1 (например, 4-HNE, H₂O₂) и провоспалительных агентов (например, брадикинина, NGF) происходит при хронических заболеваниях дыхательной системы [12,13]. Прямая

(4-HNE, H₂O₂) или опосредованная (брадикинин) активация рецептора и увеличение его экспрессии в нейронах ведут, в результате, к высвобождению нейротрансмиттеров, которые вызывают нейрогенное воспаление [8,198]. Действие гипохлорита и H₂O₂ на дыхательную систему мышей вызывает угнетённость дыхания у животных дикого типа, которая значительно меньше у мышей с нокаутным TRPA1 геном [10]. Ингибитор рецептора TRPA1, HC-030031, снижает высвобождение нейромедиаторов, экстравазацию плазмы в трахею и бронхиальное сокращение у морских свинок, подвергшихся воздействию акролеина, кротональдегида и сигаретного дыма [8]. В модели астмы у TRPA1-нокаутных мышей, а также у мышей дикого типа под действием HC-030031, уменьшается выработка цитокинов, хемокинов, нейромедиаторов, лейкоцитарная инфильтрация и гиперреактивность дыхательных путей [198]. Однако, инактивация TRPA1 приводит к потере защитных рефлексов в ответ на воздействие летучих раздражителей, поэтому вопрос безопасности использования антагонистов рецептора остаётся открытым.

Нарушение функции кишечника приводит к хроническим расстройствам желудочно-кишечного тракта и воспалительным заболеваниям таким, как неспецифический язвенный колит и болезнь Крона [199,200]. У пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника наблюдается повышенный уровень нейропептидов SP и CGRP в плазме и эпителии кишечника [201,202]. Кроме того, они часто страдают от болей в животе, которые, скорее всего, возникают в результате сенсibilизации висцеральных ноцицепторов, иннервирующих желудочно-кишечный тракт [203].

Рецептор TRPA1 экспрессируется в не нейрональных клетках кишечника [204,205], DRG нейронах и чувствительных волокнах, иннервирующих желудочно-кишечный тракт [182,206–208]. Рецептор распознаёт воспалительные агенты присутствующие в кишечнике и выделяемые нейронами нейропептиды, то есть опосредует функции чувствительных волокон. В моделях DSS- (декстран сульфата натрия) или TNBS- (тринитробензолсульфоновая кислота) индуцированного колита у TRPA1-нокаутных мышей, также у мышей дикого типа под действием антагонистов, значительно снижается ноцицептивная боль [18,19], а в моделях панкреатита уменьшается нейрогенное воспаление [209–211].

Боли, сопровождающие хронические артриты, тоже возникают в результате активации рецептора TRPA1 [212]. У TRPA1-нокаутных мышей по сравнению с диким типом уменьшаются отёк лапы и механическая гиперчувствительность, индуцируемые введением CFA. В свою очередь, в тесте MIA- (моноиодацетат натрия) индуцируемого артрита также снижается механическая гиперчувствительность и увеличивается нагрузка, удерживаемая на конечности с остеоартритом [212].

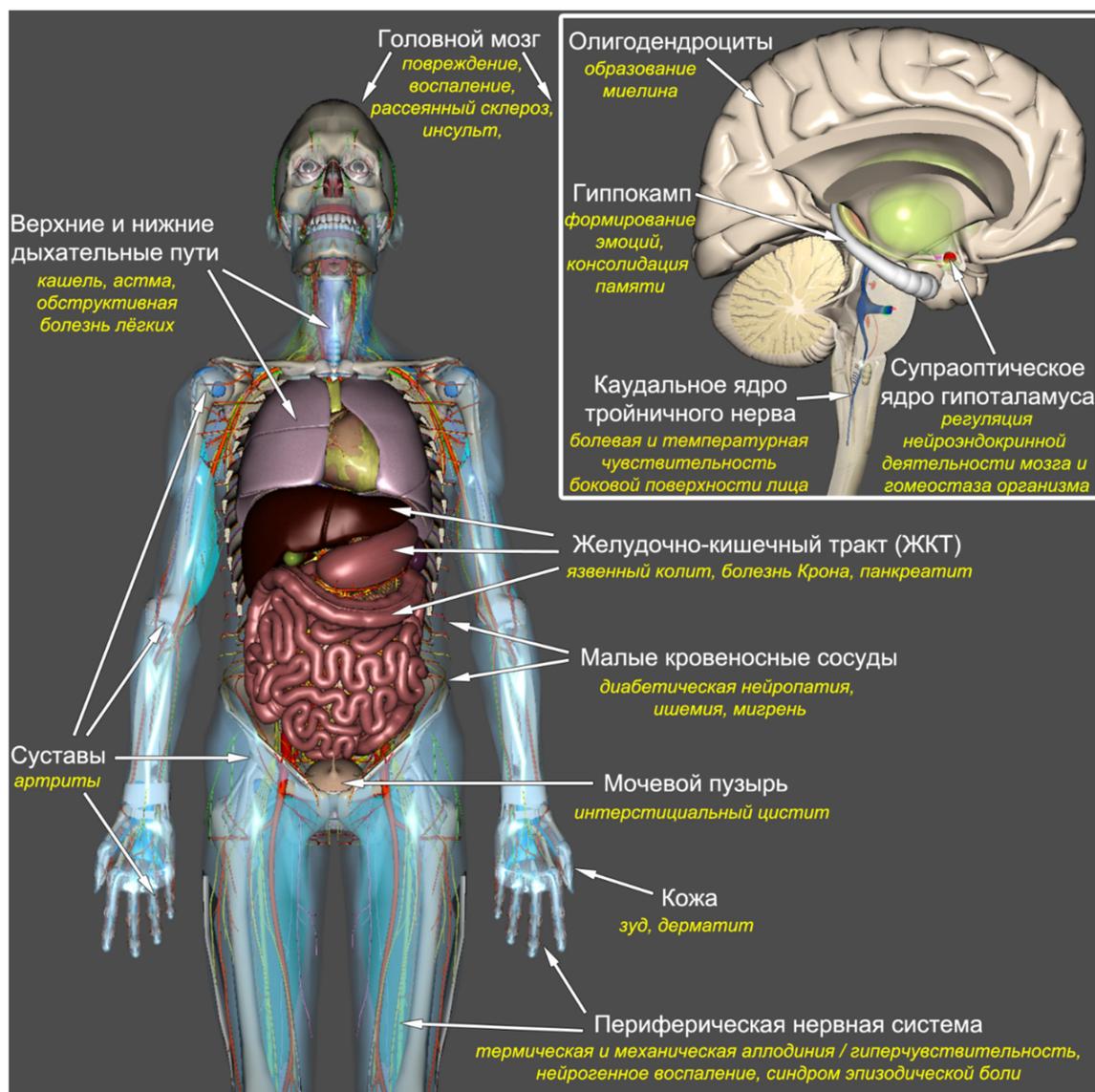


Рисунок 15. Локализация экспрессия TRPA1 в организме человека (белым) и физиологические/патологические процессы, в которых участвует рецептор (жёлтым).

Ощущение зуда связано с возбуждением уникальных чувствительных нейронов, не воспринимающих болевые стимулы [213]. Интересно, что механическое воздействие

на кожу ингибирует зуд и, следовательно, предотвращает повреждение тканей, вызываемое расчёсыванием [214]. Ощущение зуда является результатом стимуляции двух различных популяций «С» волокон: нечувствительных к механическим воздействиям или гистамин-активируемых и механочувствительных ноцицепторов [215,216]. Последние экспрессируют GPCR рецепторы, с которыми взаимодействуют серотонин, хлорохин, лейкотриен В₄, SP или активные формы кислорода, запуская каскад реакций, активирующий TRPA1 и, следовательно, вызывающий зуд [5,106,217,218].

Гиперэкспрессия TRPA1 в механочувствительных нейронах, не активирующихся гистамином, является причиной хронического зуда при атопических и аллергических контактных дерматитах [4–7]. Высокий уровень экспрессии при атопическом дерматите наблюдается также в клетках кожи, тучных клетках и кератиноцитах. У мышей в модели атопического дерматита, индуцированного гиперэкспрессией IL-13, уровень экспрессии TRPA1 в чувствительных волокнах, спинномозговых ганглиях и тучных клетках аналогичен уровню экспрессии у больных людей [6]. В модели контактного дерматита, индуцируемого оксазолоном, как ингибирование рецептора, так и генетическое удаление TRPA1 приводит к уменьшению количества провоспалительных цитокинов, Т-клеточного инфильтрата, отёка и, следовательно, снижению степени тяжести дерматита [5].

Интерстициальный цистит (ИЦ) или синдром болезненного мочевого пузыря является хроническим женским заболеванием. Также ИЦ развивается после химиотерапии циклофосфамидом или ифосфамидом. Метаболизм этих препаратов приводит к образованию и накоплению акролеина в моче [20]. Антагонисты TRPA1 значительно снижают циклофосфамид-индуцированную гиперактивность мочевого пузыря (неотложный позыв к мочеиспусканию с недержанием или без) у крыс [219]. Кроме того, в модели гиперактивности мочевого пузыря вследствие повреждения спинного мозга антисмысловые олигонуклеотиды и антагонисты TRPA1 уменьшают количество сокращений мышечной стенки без мочеиспускания [220]. Гиперактивность мочевого пузыря обычно развивается вследствие инфекционных заболеваний, сахарного диабета, увеличения предстательной железы и различных неврологических расстройств центральной нервной системы, например, травм спинного мозга или рассеянного

склероза [221–223]. Более того, много людей страдает от гиперактивности мочевого пузыря без видимых на то причин.

Электрофильные активаторы TRPA1 могут вызывать периферические нейропатии, сопровождающиеся повышенной механической чувствительностью. Агонист рецептора, метилглиоксаль (рис. 14), образуется в организме при увеличении содержания глюкозы в сыворотке крови и вызывает диабетическую нейропатию [224]. В литературе нет данных об уменьшении нейропатических болей в моделях диабета у TRPA1-нокаутных мышей. Однако, при интратекальном введении антагониста TRPA1, СЕМ-5861528, в модели стрептозотоцин-индуцируемого диабета у крыс снижается механическая аллодиния [225,226] и восстанавливаются нервные окончания, иннервирующие кожу [227]. В 2014 году Glenmark Pharmaceuticals Ltd. заявила, что их ингибитор TRPA1, GRC 17536, успешно прошёл Фазу 2а клинических испытаний среди пациентов, страдающих от диабетических нейропатий.

Нейротоксичность является одним из специфических системных осложнений противоопухолевой химиотерапии, которая вызывает термическую и механическую аллодинию. Химическая среда, которую создают раковые клетки, может способствовать экспрессии, сенсibilизации или активации TRPA1 [21,22]. В моделях химиотерапия-индуцируемой нейропатии, вызванной паклитакселом, бортезомибом или оксалиплатином у TRPA1-нокаутных мышей, а также у мышей дикого типа под действием HC-030031, значительно уменьшается механическая аллодиния [168,228].

Рецептор TRPA1 присутствует также в головном мозге [229,230] и на поверхности спинного мозга [147,231]. Он был найден в пресинаптической части глутаматергических нейронов супраоптического ядра гипоталамуса грызунов [232], а также в астроцитах каудального (хвостового) ядра тройничного нерва и гиппокампа, где TRPA1 потенциально регулирует синаптическую активность, длительную потенциацию и выживание нейронов [233–236]. Физиологическая роль рецептора в центральной нервной системе не очевидна, поскольку спинной и головной мозг не подвергаются непосредственному воздействию термических, механических или химических стимулов. Однако TRPA1 активируется под действием эндогенных молекул (акролеина, гепоксилина А3, активных форм кислорода, эпоксиэйкозатриеновых кислот), которые синтезируются в спинном мозге при ноцицепции, а также повреждении или воспалении нервной ткани [237–240].

Активаторы рецептора TRPA1, АІТС и коричный альдегид, увеличивают частоту спонтанного возникновения и затухания постсинаптических токов в нейронах желатинозной субстанции спинного мозга и ядрах тройничного нерва [241–244]. Интратекальное введение TRPA1 агонистов вызывает тактильную аллодинию, а иногда даже тепловую гиперчувствительность [237,238,240,245,246]. В некоторых случаях активация рецептора имеет антиноцицептивный эффект. Например, электрофильные метаболиты ацетаминофена активируя TRPA1 в спинном мозге вызывают десенсбилизацию потенциал-чувствительных кальциевых и натриевых каналов, что снижает скорость высвобождения нейромедиаторов и, следовательно, уменьшает возбудимость нейронов [147]. Нековалентно связывающийся с рецептором агонист Δ^9 -тетрагидроканнабиол также обладает анальгезирующим эффектом при действии на чувствительные нейроны спинного мозга [147]. Ингибирование спинномозгового TRPA1 антагонистами рецептора (НС-030031, AP-18, СЕМ-5861528, А967079) уменьшает у мышей механическую аллодинию и механическую гипералгезию, вызываемые периферическим введением капсаицина или АІТС [225,226,247–250].

Ишемия характеризуется недостатком кислорода и питательных веществ из-за уменьшения притока крови, приводящего к временной дисфункции или стойкому повреждению ткани или органа. Рецептор TRPA1, экспрессирующийся чувствительными нейронами, участвует в регуляции артериального давления (АД) и активности симпатической нервной системы (СНС) [251]. При ишемии значительно увеличивается экспрессия TRPA1 в спинномозговых ганглиях, введение АІТС вызывает повышение АД и увеличение активности СНС в почках, а антагонист НС-030031 значительно снижает периферическое нарушение чувствительности (дизестезию) у мышей. В восприятии болевых сигналов при ишемии участвуют только миелинизированные чувствительные нейроны [252], поэтому нарушение работы нервных клеток за счёт Ca^{2+} -зависимого повреждения олигодендроцитов, синтезирующих миелин, является одним из опаснейших последствий ишемии головного мозга. Известно, что активация TRPA1 в олигодендроцитах при ишемии головного мозга приводит к демиелинизации аксонов, соответственно, ингибирование TRPA1 рутением красным, изопентенилпирофосфатом, НС-030031, А967079, также как и нокаут гена рецептора, предотвращают нарушение миелиновой оболочки в модели ишемии, но не влияют на повреждение глиальных и нейрональных клеток [23,253].

Таким образом, блокирование TRPA1 на олигодендроцитах уменьшает потерю миелина во время энергетического голода, который следует за инсультом, вторичной ишемией, вызванной повреждением спинного мозга, или при рассеянном склерозе [23].

Рак развивается в результате нарушения физиологических процессов, например, пролиферации или апоптоза. Все эти процессы контролируются кальциевым гомеостазом и, как следствие, TRP каналами, экспрессия которых в раковых клетках намного выше, чем в нормальных. Хотя рецептор TRPA1 скорее всего не участвует в развитии рака, он принимает участие воспалительных процессах (например, колит и воспаление при раке кишечника), сопровождающих образование опухоли [19,254]. Кроме того, было показано, что активация TRPA1 агонистом АИТС способствует выживанию и повышению пролиферации мелкоклеточного рака лёгких [255].

Хорошо известно, что при местном применении агонисты TRPA1 вызывают жжение, механическую и термическую гиперчувствительность, а также нейрогенное воспаление [1–3]. При аутосомно-доминантном синдроме эпизодической боли (СЭБ), причиной которого является мутация (N885S) в S4 трансмембранном сегменте TRPA1, изменяются потенциал-зависимые характеристики рецептора, в результате чего он становится гиперчувствительным к электрофильным агонистам и низким температурам при нормальном мембранном потенциале [172]. У людей, страдающих от СЭБ, после местного нанесения горчичного масла развивается гипералгезия на точечные механические воздействия, а также появляется эпизодическая боль в верхней части тела, которую можно спровоцировать стрессом (например, голоданием), холодом или физическими упражнениями [172]. Другая мутация - полиморфизм единичного нуклеотида на N-конце рецептора (E179K) - приводит к парадоксальному ощущению жара. Клетки НЕК293Т/17 трансфицированные мутантным TRPA1 (E179K) не реагируют на низкие температуры, в отличие от клеток с рецептором дикого типа [173,174].

Сигаретный дым и формальдегиды провоцируют головные боли у некоторых людей [256], поэтому появилось предположение, что TRPA1 участвует в развитии мигрени. Мигрень - это неврологическое заболевание, характеризующееся эпизодическими или регулярными сильными приступами головной боли, которую связывают с сосудистой головной болью. Агонист TRPA1, умбеллулон, найденный в листьях умбеллюлярии калифорнийской, активирует тройнично-сосудистую систему и

вызывает мигрень [257]. Вещества, обладающие противомигренозным эффектом, такие как партенолид (parthenolide), компонент лекарственного растения пиетрума (*Tanacetum parthenium* L.), активирует и десенсibiliзирует рецептор, препятствует высвобождению CGRP из тройничных нейронов, и, следовательно, сужает сосуды и ослабляет головную боль [126].

Агонисты TRPA1 образуются в организме при воспалении или бактериальной инфекции. Многие эндогенные медиаторы активируют TRPA1 или увеличивают его экспрессию в нейронах и соматических клетках организма посредством различных сигнальных путей, вызывая гипералгезию, аллодинию, зуд и др. Холодовая и механическая аллодиния наблюдаются, в основном, у людей с нейропатиями, а модуляция TRPA1 не сопровождается ни повышением, ни понижением температуры тела. Гиперэкспрессия рецептора часто наблюдается в нейронах, находящихся рядом с повреждёнными тканями, в ответ на нейровоспалительные сигналы [11]. Таким образом, рецептор является важной фармакологической мишенью, для поиска и создания новых лекарственных препаратов.

2.6. Модуляторы рецептора TRPA1 и их клинические перспективы

Несмотря на то, что ингибирование кажется наиболее логичным методом модуляции рецептора при патологических состояниях, некоторые агонисты TRPA1 так же могут проявлять антиноцицептивный эффект. Стоит отметить, что модуляторы крысиного или мышиноного рецептора не всегда действуют аналогичным образом на человеческий TRPA1, поэтому возможны трудности при *in vivo* исследованиях на грызунах. Решением этой проблемы могли бы, например, послужить гуманизированные трансгенные животные (мыши с человеческим TRPA1) [104].

К видоспецифичным модуляторам TRPA1 относится ментол, который обладает бимодальным действием на рецепторы грызунов (активация при низких концентрациях и десенсibiliзация при высоких), активирует человеческий TRPA1 (при высоких концентрациях), а рецепторы дрозофил к нему не чувствительны [152]. С помощью мутагенеза и химерных конструкций было установлено, что в связывании с ментолом

принимают участие S5 трансмембранный сегмент и поровая петля. Наиболее важными аминокислотными остатками, участвующими во взаимодействии мышиного TRPA1 с ментолом, являются Ser876 и Thr877, а в человеческом TRPA1 - Ser873 и Thr874. Стоит отметить, что антагонисты AP-18, A967079 (рис. 18) и AMG5445 тоже связываются с серином и треонином S5 трансмембранного сегмента рецептора [112,152]. Причём, AMG5445 демонстрирует видоспецифичность действия: ингибирует человеческий TRPA1 и активирует крысиный рецептор [258]. Структурный аналог AMG5445, 4-метил-N-(2,2,2-трихлор-1-(4-нитрофенил сульфанил)-этил)-бензамид (CMP1), тоже ингибирует человеческий и активирует крысиный рецептор, но посредством модификации Cys621 и Cys622, соответственно [103,259]. Мутации Ala946Ser и Met949Ile в крысином TRPA1 меняют эффект CMP1 на противоположный. Пропофол и лидокаин, как и ментол, обладают бимодальным действием на мышиный рецептор и активируют человеческий TRPA1, хотя связываются только с поровой петлёй [118,260]. Докозагексаеновая кислота (ДНА) (рис.16), которая является незаменимой полиненасыщенной жирной кислотой класса Омега-3, активирует человеческий и мышиный рецепторы, связываясь с N-концевой областью белка, а TRPA1 дрозофил с ней не взаимодействует [123]. Возможно, лидокаин, пропофол, ДНА и ментол взаимодействуют с рецептором по отчасти схожему механизму.

Кофеин является неэлектрофильным агонистом мышиного рецептора и антагонистом человеческого [261]. Мутация Met268Pro на N-конце мышиного TRPA1 изменяет эффект кофеина с активации на ингибирование [262].

В целом, видовые различия в аминокислотной последовательности рецептора являются серьезной проблемой, которая требует творческих решений.

2.6.1. Агонисты TRPA1

Электрофильные агонисты TRPA1 (рис. 16) активируют рецептор посредством модификации трёх цистеинов и лизина, расположенных между анкириновым доменом и S1 трансмембранным сегментом (например, Cys621, Cys641, Cys665 и Lys710 у человека) (рис. 10Б). К веществам, связывающимся с этими аминокислотными остатками, относятся острые компоненты съедобных растений (аллицин из чеснока [115]), α,β -ненасыщенные альдегиды (акролеин из выхлопных газов или N-

метилмалеимид [101]), раздражающие компоненты слезоточивого газа (хлорацетофенон) [9], α,β -ненасыщенные карбонильные соединения (метилвинилкетон) [263], компоненты растительного происхождения (умбеллулон) [125,257], эндогенные провоспалительные агенты (H_2O_2 [10,119,120,133], метилглиоксаль [16,17], продукты окислительного стресса и перекисного окисления липидов [88,118,120,133]), и другие соединения (глибенкламид [264], лидокаин [265]).

Аллилизотиоцианат (васаби, горчица), а также коричный альдегид (коричное масло), модифицируют Cys415, Cys422 и Cys622 мышинного TRPA1, которые соответствуют Cys414, Cys421, и Cys621 в человеческом рецепторе [100]. Внутриклеточные ионы цинка активируют TRPA1 посредством взаимодействия с Cys641 и С-концевыми Cys1021/His983 [266], а под действием O_2 окисляются Cys633 на N-конце и/или Cys856 на линкере между S4 и S5 трансмембранными доменами. Умбеллулон активирует мышинный мутантный TRPA1 (Cys622Ser), чуть менее эффективно, чем TRPA1 дикого типа [125]. Кроме того, уменьшение электрофильных свойств агониста (дигидроумбеллулон) сохраняет остаточную активность относительно TRPA1. Следовательно, умбеллулон способен связываться и с цистеинами, и нековалентно взаимодействовать с другим сайтом на рецепторе. Найденный в грибах, изовеллерал, хотя и содержит α,β -ненасыщенный альдегидный мотив, активирует TRPA1 не модифицируя цистеины [267]. Основной компонент оливкового масла, олеокантал, относится к электрофильным агонистам рецептора, но не взаимодействует с цистеинами [149], хотя в активации TRPA1 участвуют альдегидные группы олеокантала. Активация TRPA1 α -гидрокси-саншулом (α -SOH), компонентом китайского зантоксилума перечного, осуществляется посредством цистеинов на N-конце рецептора [268]. Интересно, что цис-С6 конфигурация синтетических аналогов α -SOH увеличивает степень активации рецептора агонистом.

Все перечисленные выше электрофильные соединения взаимодействуют с рецептором за счёт модификации аминокислотных остатков, чаще всего цистеинов. К другому классу агонистов TRPA1 относятся соединения, которые нековалентно связываются с рецептором (рис.16), причём механизм взаимодействия этих молекул не известен.

Ицилин и 2-аминоэтилоксидифенил борат (2-APB) являются неэлектрофильным соединениям и активируют TRPA1 не зависимо от модификации цистеинов [101]. К

подобным агонистам относятся также нестероидные противовоспалительные препараты (диклофенак [148]), общие анестетики (изофлуран [269]), фарнезилтиосалициловая кислота (салирасиб) [270], и другие (например, блокатор хлоридных каналов NPPB).

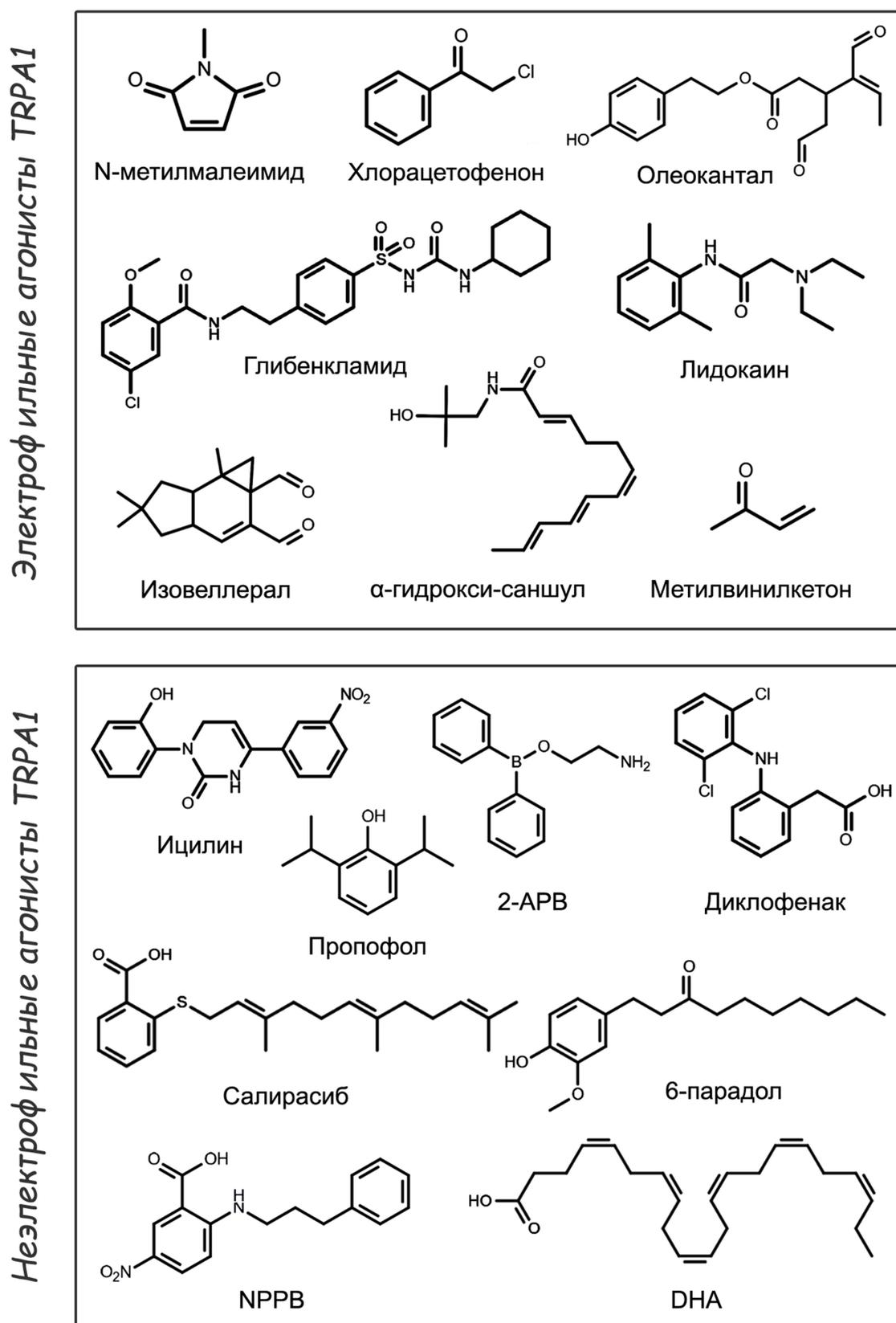


Рисунок 16. Агонисты рецептора TRPA1.

Структурно-функциональные исследования NPPB (5-нитро-2-(3-фенилпропиламино)бензойная кислота) установили, что во взаимодействии с TRPA1 участвуют фенилалкильные, карбонильные и нитрогруппы [271]. Интересно, что салирасиб и NPPB демонстрируют одинаковый механизм активации рецептора. Неэлектрофильными агонистами TRPA1 являются полиненасыщенные жирные кислоты, содержащие минимум три двойные связи и 18 углеродных атомов, например, ДНА и арахидоновая кислота [123]. Алкилфенольные соединения (тимол, пропофол, карвакрол) и структурные аналоги капсаицина (6-парадол, 6-гингерол, капсиат), но не капсаицин, активируют рецептор не связываясь с цистеинами и гистидином, причём фенольное ядро молекул вряд ли участвует во взаимодействии с TRPA1 [86,154,260,268,272,273]. Таким образом, действие неэлектрофильных агонистов на рецептор зависит, скорее всего, от их химической структуры.

Многие активаторы TRPA1 обладают бимодальным действием на рецептор, то есть активируют рецептор при низких концентрациях и десенсибилизируют при высоких. Например, ментол и его производные [154], никотин [153], пропофол [260], а также коричный альдегид [155], АИТС [151], умбеллулон [125] и другие.

2.6.2. Антагонисты TRPA1

К природным антагонистам человеческого TRPA1 (рис. 17) относятся камфара [157] (камфорный лавр, базилик, полынь, розмарин) и 1,8-цинеол [274] (кардамон, эвкалипт лимонный, шалфей, мята и др.), однако они слабо ингибируют рецептор. Интересно, что 1,4-цинеол [274], содержащийся в тех же эфирных маслах, что и его гомолог, является агонистом TRPA1. Борнеол из борнейского лавра немного эффективнее ингибирует рецептор, чем камфара и 1,8-цинеол [157]. Гидроксильные группы борнеола взаимодействуют с Ser873, Thr874 и Tyr812, механизм взаимодействия TRPA1 с камфарой и 1,8-цинеолом не известен [157]. Недавние исследования показали, что кардамонин, выделенный из травянистого растения *Alpinia katsumadai hayata* семейства Имбирные, избирательно блокирует (IC_{50} 454 нМ) активацию TRPA1, взаимодействует с сайтом связывания антагониста A967079 на рецепторе и не проявляет цитотоксичности [275]. К неспецифическим антагонистам рецептора (рис. 17) относятся как неорганические вещества (рутений красный, гадолиний), так и органические

соединения (амилорид, гентамицин) [144]. В связи с недостатком эффективных селективных природных ингибиторов TRPA1, с подходящими для создания лекарственных препаратов свойствами, область поиска антагонистов была сужена до синтетических молекул, которых сейчас насчитывается около пятидесяти.

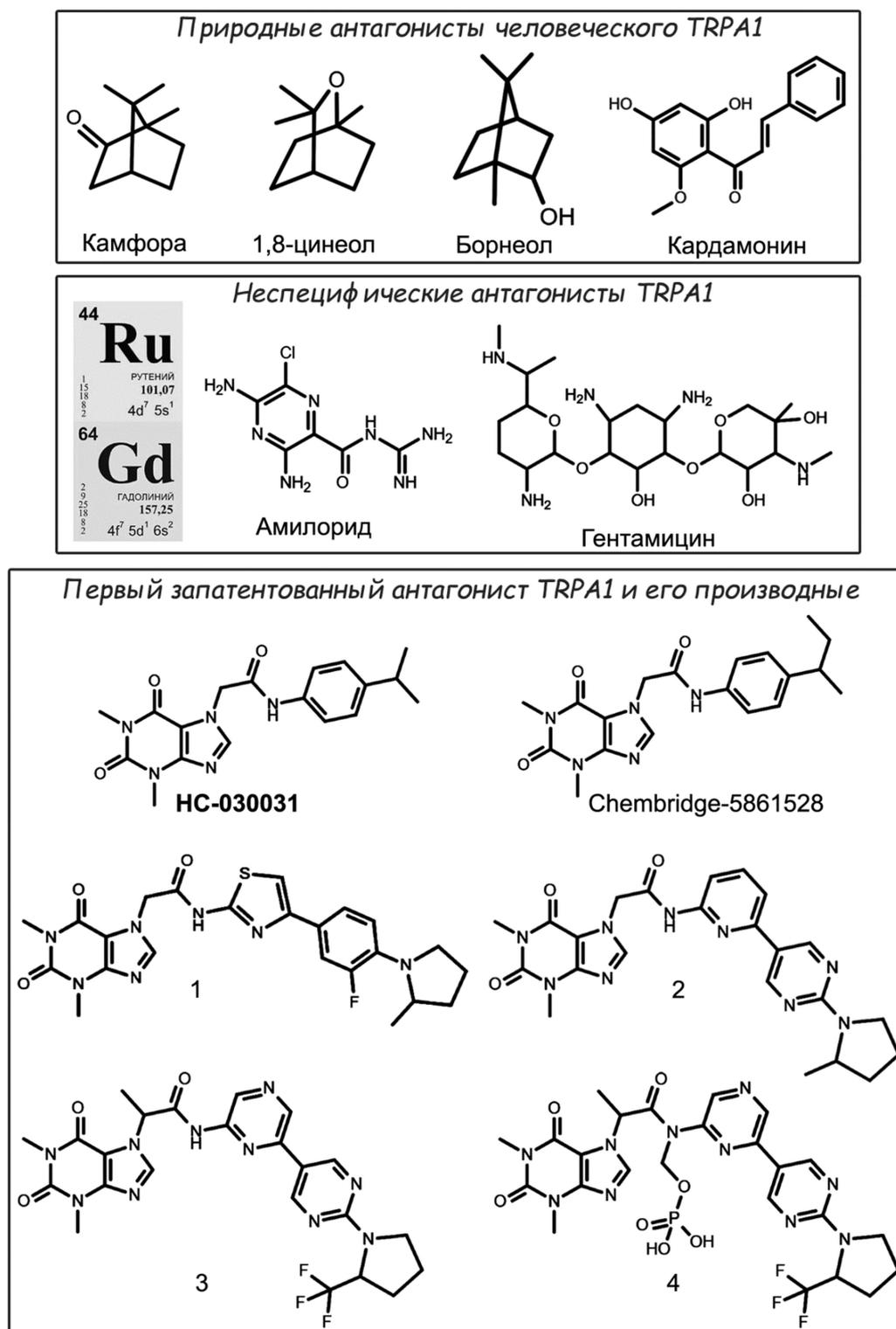


Рисунок 17. Антагонисты рецептора TRPA1.

Первым запатентованным антагонистом TRPA1 было производное ксантина, HC-030031 (рис. 17), которое действует на рецептор в микромолярных концентрациях [276,277]. HC-030031 является эталонным соединением и используется в качестве фармакологического инструмента для подтверждения участия TRPA1 в различных патологических процессах. HC-030031 селективно ингибирует рецептор во многих ноцицептивных моделях, и на его основе было синтезировано большое количество антагонистов [198,278]. Chembridge-5861528 (CHEM-5861528), аналог HC-030031, эффективно предотвращает гиперчувствительность при диабете, и его применение при остром или хроническом протекании заболевания не сопровождается серьёзными побочными эффектами [226]. Оптимизация структурно-функционального профиля HC-030031 привела к созданию производного **(1)**, которое ингибирует TRPA1 в наномолярных концентрациях, но увеличивает функцию печени в животных моделях [279]. Дальнейшие модификации позволили синтезировать производное **(2)**, обладающее чрезвычайно высокой селективностью к TRPA1 и анальгезирующим действием без побочных эффектов [279,280]. Однако его применение ограничивается низкой растворимостью в воде. На основе соединения **(2)** были созданы антагонисты **(3)** и **(4)** отличающиеся на метилфосфатную группу. Первый был эффективнее **(2)**, но также обладал низкой растворимостью, а второй, наоборот, хуже ингибировав и лучше растворялся в воде. Удаление *in vivo* метилфосфатной группы соединения **(4)** обеспечивает доставку вещества **(3)** в организм и последующее ингибирование рецептора [281]. Большинство производных HC-030031 (рис. 17) обладают низкой растворимостью и не подходят для создания лекарственных препаратов, а введение заместителей улучшающих растворимость и фармакокинетику соединений уменьшает их эффективность. Оптимизация фармакокинетических свойств позволила синтезировать новый высокоселективный ксантиноподобный антагонист TRPA1, AM-0902 **(5)**, который ингибирует крысиный и человеческий рецепторы в наномолярных концентрациях и снижает АИТС-индуцированное воспаление у крыс [282] (рис. 18).

Трициклический антагонист TRPA1 **(6)** ингибирует рецептор в наномолярных концентрациях, однако потенциально токсичный фрагмент тиомочевины ограничивает его клинические исследования [283]. Гетероциклический амид **(7)** обладает хорошей фармакокинетикой и обезболивающим эффектом при индуцировании мышцей горчицей маслом, но не эффективен в моделях воспаления и повышенной

реактивности дыхательных путей [284]. Представителем другого класса химических соединений является вещество **(8)**. Карбаматный фрагмент придаёт соединению электрофильные свойства, что свидетельствует о ковалентном связывании антагониста с TRPA1 [285]. AP-18 является производным оксимов, он ингибирует рецептор в микромолярных концентрациях и уменьшает вызванный коричневым альдегидом ноцицептивный ответ. AP-18 ковалентно связывается с TRPA1, а замена метильной группы в третьем положении меняет эффект на противоположный [286]. Другое производное оксимов, A967079, высоко селективно ингибирует рецептор в наномолярных концентрациях и эффективен в моделях патологической боли [167]. Трихлор(сульфонил)этилбензамиды **(9)** являются эффективными антагонистами TRPA1, но из-за своей высокой реакционной способности не могут применяться для разработки лекарственных препаратов [144]. (рис. 18)

Производное декалина, AZ465 **(10)**, это селективный антагонист, который в наномолярных концентрациях полностью блокирует Ca^{2+} ток в НЕК клетках, экспрессирующих человеческий TRPA1 [287,288]. Исследования *in vivo* показали, что AZ465 на 50%–60% ингибирует высвобождение CGRP у человека в пульпе [287]. Поскольку его аналоги обратимо блокируют TRPA1-опосредованный ток *in vitro*, то, несмотря на электрофильную природу можно утверждать, что AZ465 связывается с рецептором не ковалентно [289]. Производное 1-арилоксиизохинолина **(11)** является эффективным видоспецифичным антагонистом, который нуждается в дальнейшей оптимизации своих свойств [290]. (рис. 18)

Производное гетероциклических амидов **(12)** ингибирует TRPA1 в наномолярных концентрациях и снижает механическую аллодинию на 80%–97% [291]. Модифицированный 5-(2-хлорфенил)индол **(13)** демонстрирует наномолярную эффективность, многообещающую фармакокинетику и отсутствие видоспецифичности. В *in vivo* моделях он снижает аллодинию и висцеральную боль [292]. (рис. 18)

Ещё один карбоксамид-содержащий антагонист TRPA1 **(14)**, ингибирующий рецептор в наномолярных концентрациях, несмотря на низкую пероральную биодоступность, способен накапливаться в коже человека. Соединение уменьшает индуцированное коричневым альдегидом кожное покраснение у грызунов при местном применении без значительного системного воздействия на организм. [293] (рис. 18) Одноатомная замена ароматического N на C в слабоосновном лиганде GSK205,

ингибирующем rTRPV4 и mTRPA1 в микромолярных концентрациях, на порядок увеличивает активность соединения. Полученное вещество (15) снижает боль, вызванную раздражением тройничного нерва, и уменьшает воспаление и боль при остром панкреатите, которые, как известно, опосредуются активацией TRPV4 и TRPA1. [294] (рис. 18)

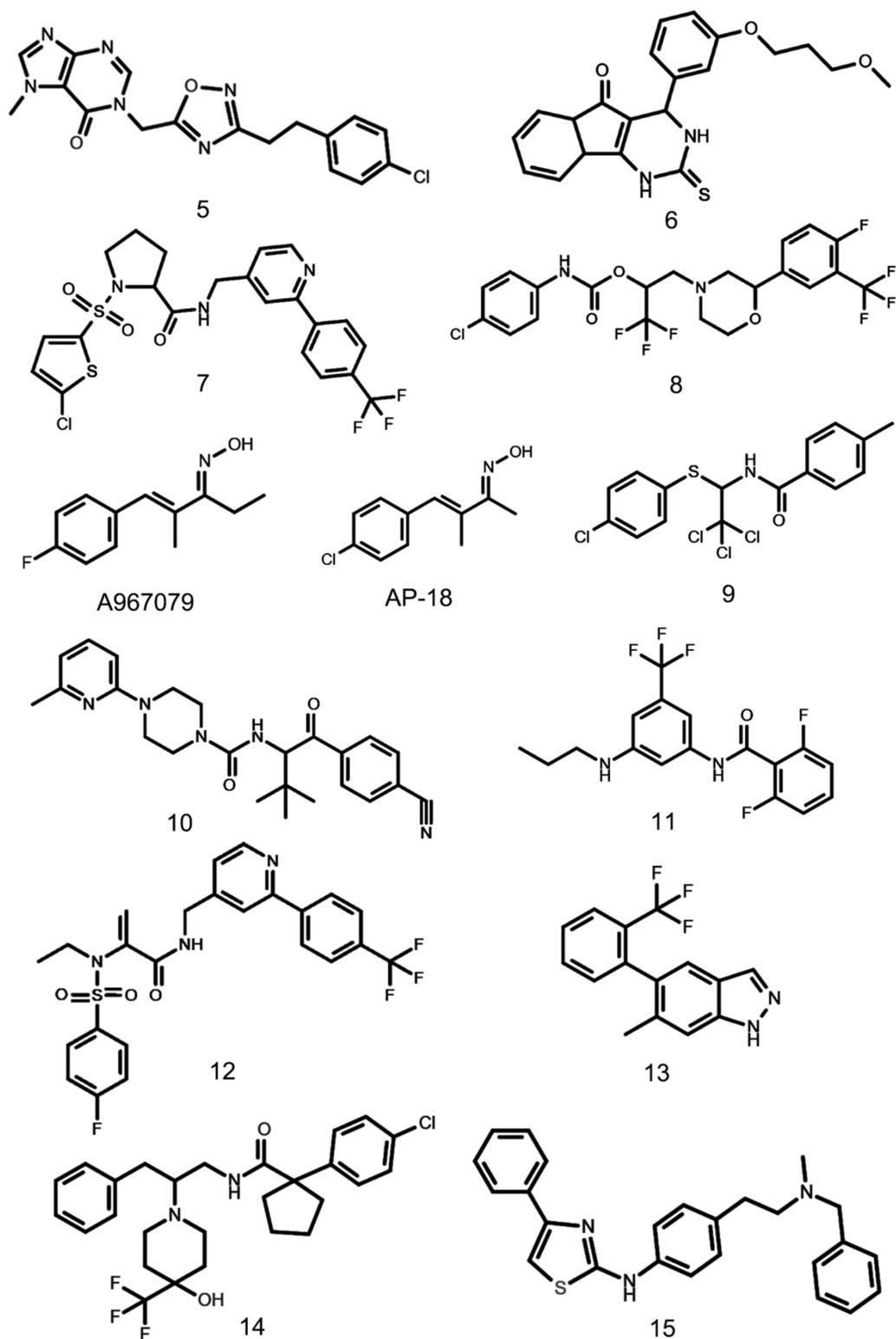


Рисунок 18. Антагонисты рецептора TRPA1 (продолжение).

На основе пептида ProTx-I (PubChem CID:90488963) из яда перуанского зелёного бархатного тарантула был получен мутант, ингибирующий TRPA1. Природный ProTx-I является антагонистом потенциал-зависимого натриевого ($Na_v1.2$) канала, но аланиновое сканирование выявило две частично перекрывающиеся области на поверхности пептида, которые отвечают за связывание с TRPA1 или $Na_v1.2$. Мутант, ингибирующий TRPA1, эффективнее действует на рецептор, чем природный пептид, но сохраняет активность относительно натриевого канала [24].

Пептид $Ph\alpha1\beta$ из яда бразильского странствующего паука *Phoneutria nigriventer* обратимо ингибирует потенциал-чувствительные кальциевые каналы (VGCC) и является антагонистом TRPA1 с IC_{50} 681 нМ [295]. Причем, механизм действия $Ph\alpha1\beta$, по-видимому, зависит от исследуемой болевой модели. Ранее было обнаружено, что $Ph\alpha1\beta$ снижает механическую гипералгезию в модели послеоперационной боли [296] за счет ингибирования VGCC. В то же время обезболивающий эффект в модели периферической невропатии, вызванной химиотерапией, вероятно, обусловлен антагонистическим действием пептида на TRPA1 [295].

Другой пептидный антагонист был получен на основе трансмембранного белка Tmem100 (UniProtKB - Q9NV29), который формирует комплекс с TRPA1 и TRPV1 в DRG нейронах. У Tmem100-дефицитных мышей наблюдается снижение механической гипералгезии при воспалении. Белок Tmem100 способствует ослаблению ассоциации рецепторов TRPA1 и TRPV1, а мутантный Tmem100 увеличивает их ассоциацию и, следовательно, ингибирование TRPA1 рецептором TRPV1. Пептид, проникающий через мембрану и содержащий С-конец мутантного Tmem100 (myr/Palmitoyl-WKVRQRNKKVQQQESQTALVVNQRCLFA-COOH), ингибирует хроническую боль у мышей, а его эффект сравним с эффектом HC-030031 на TRPA1 [297].

2.6.3. Кандидаты в клинические исследования и лекарственные препараты

Парацетамол — лекарственное средство, анальгетик и антипиретик, оказывает жаропонижающее и слабое противовоспалительное действие. При системном или интратекальном введении он демонстрирует антиноцицептивный эффект [147]. Электрофильные метаболиты парацетамола, N-ацетил-п-бензохинонимин (NAPQI) и п-бензохинон (p-BQ) (рис. 14), активируют TRPA1 в электрофизиологических

исследованиях и кальциевом имиджинге, в то время как парацетамол не взаимодействует с TRPA1. Интратекальное введение NAPQI или p-BQ вызывает дозозависимый антиноцицептивный эффект в тестах горячей или холодной пластины и при давлении на лапу. В тех же тестах при системном введении эффективен и парацетамол. Поскольку в спинном мозге присутствуют ферменты, участвующие в расщеплении парацетамола на метаболиты, то за эффект парацетамола в организме ответственен именно рецептор TRPA1. Механизм действия NAPQI и p-BQ заключается в прямой активации рецептора, экспрессирующегося в спинномозговых чувствительных нейронах, которая приводит к инактивации потенциал-зависимых кальциевых и натриевых каналов, последующему уменьшению высвобождения нейротрансмиттеров и снижению общей возбудимости нейронов. Нековалентно связывающийся с TRPA1 ненаркотический каннабиноид, Δ^9 -тетрагидроканнабиол (рис. 14), является агонистом рецептора и также демонстрирует антиноцицептивный эффект при интратекальном введении мышам. Таким образом, фармакологическая активация TRPA1 может стать одним из способов лечения болезненных состояний, связанных с активностью рецептора.

Фармацевтические компании Cubist Pharmaceuticals и Hydra Biosciences, занимающиеся исследованием производных HC-030031 (рис. 17) антагонистов TRPA1, в 2012 году сообщили о начале Фазы 1 клинических испытаний небольшой молекулы CB-625, структура которой не раскрывается [298]. После этого ряд других эффективных антагонистов был синтезирован Cubist Pharmaceuticals, среди которых вещества (3) и (4) (рис. 17) [281]. Данных о начале клинических испытаний этих веществ пока нет.

В сентябре 2014 года фармацевтическая компания Glenmark Pharmaceuticals заявила об успешном завершении Фазы 2а клинических испытаний GRC 17536, высокоселективного антагониста TRPA1, действующего в наномолярных концентрациях, структура которого не раскрывается. GRC 17536 продемонстрировал высокую эффективность в моделях воспаления, нейропатии и респираторных заболеваний [299,300]. Статистически и клинически значимые результаты были получены при исследовании антагониста на пациентах с диабетом, страдающих от нейропатической боли второй и третьей степени тяжести с относительно неповреждённой чувствительностью. GRC 17536 хорошо переносился пациентами и не вызывал видимых побочных эффектов со стороны ЦНС или других органов [301]. В

2016 году планировалось начало проведения Фазы 2b клинических исследований [302]. Данные Фазы 2a клинических испытаний (на людях, страдающих от хронического кашля и атопической астмы) ещё не опубликованы.

Таким образом, молекулы, модулирующие активность рецептора, которые «выключают» из воспалительного процесса и болевой сигнализации часть нейронов, что приводит к анальгезирующему и противовоспалительному эффекту, могут стать основой новых лекарственных препаратов. А сам TRPA1 уже завоевал место одной из самых важных терапевтических мишеней, поскольку участвует в большом количестве патологических состояний организма.

3. Материалы и методы

3.1. Материалы и оборудование

3.1.1. Реактивы и материалы

При выполнении данной работы были использованы ферменты, реактивы и расходные материалы следующих производителей: Invitrogen (США), Novagen (США), Евроген (Россия), Waters (США), Phenomenex (США), Sigma-Aldrich (США), Ambion (Канада), Applied Biosystems (США), Fermentas (Литва), Clontech (США), Difco Laboratories (США), Thermo Fisher Scientific Inc. (США), Paneco (Россия), New England Biolabs (США), Promega (США), ICN (США), Химмед (Россия), Криохром (Россия). Все реактивы российских производителей имеют квалификацию «ос.ч.»/*«ч.д.а.»*, а реактивы зарубежных производителей с маркировкой *«for molecular biology»/«analytical reagent»* (для молекулярной биологии или для аналитической работы). Растворы готовились на деионизированной воде сопротивлением 18.2 МОм, полученной с помощью установки Milli-Q system (Millipore, США). Для работы с клеточными культурами использовалась автоклавированная вода. Короткие олигонуклеотидные последовательности (≤ 51 н.о.) для сбора генов были синтезированы компанией Евроген (Россия).

3.1.2. Биологический материал и животные

В качестве источников биологически активных соединений были использованы лиофилизированные яды полученные из актиний *Metridium senile* и *Utricina eques*, в Norwegian College of Fishery Science, Faculty of Biosciences, Fisheries and Economics, UiT - The Arctic University of Norway, Tromsø, Norway.

Кальциевый имиджинг проводили на стабильной линии клеток СНО (Chinese Hamster Ovary), гетерологично экспрессирующих рецептор TRPA1, а также на DRG (dorsal root ganglion - спинномозговые ганглии) нейронах 4-6 месячных крыс дикого типа.

Для электрофизиологических исследований использовали ооциты лягушек *Xenopus laevis*, экспрессирующие крысиный TRPA1.

Для исследований *in vivo* были взяты мыши линии CD-1 весом 20-25 г (НПП «Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН»).

Работа с животными проводилась в соответствии с законодательством Российской Федерации и положением «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей». Животных содержали при температуре $23\pm 2^\circ\text{C}$ и не ограничивали доступ к еде и воде. Каждая особь была использована в эксперименте только один раз. Контрольная группа животных получала физиологический раствор (0.9% NaCl).

3.1.3. Бактериальные штаммы и плазмидные векторы

Для клонирования генов был использован штамм *E. coli* XL1-Blue, а экспрессия генов осуществлялась в штамме *E. coli* BL21(DE3). В ходе работы использовались готовые плазмидные векторы pVAX1 (Invitrogen, США), pET32b (Novagen, США), pAL-TA (Евроген, Россия).

3.1.4. Среды для выращивания бактерий

Жидкая питательная среда LB содержит 10 г/л бактотриптона, 5 г/л дрожжевого экстракта и 10 г/л NaCl. Твердая питательная среда имеет тот же состав с добавлением агара до конечной концентрации 1.5%. Все среды перед употреблением стерилизовали автоклавированием.

3.1.5. Оборудование

- Автоматический секвенатор белков ProCise model 492 (Applied Biosystems, США).
- Амплификатор PTC-200 (MJ Research, Inc., США).
- Бинокулярный микроскоп МБС-10 (Россия).
- Вакуумный коллектор CHROMABOND® для твердофазной экстракции (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Германия).
- Вакуумный насос APS 100 (Tetra, Германия).
- ДНК анализатор ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, США).
- Испаритель влаги Acid-Resistant CentriVar Concentrator с системой охлаждения CentriVar Cold Trap -84°C (Labconco®, США).
- Лабораторный pH-метр pH-420 (Аквилон, Россия).

- Ламинарный шкаф Gelaire BSB 4 (Flow Laboratories Ltd., Италия).
- Лиофильная сушка FreeZone 2.5 (Labconco®, США) с масляным вакуумным насосом W series 5 8912A (Welch®, США).
- Магнитные мешалки MM-2A (Laboratorní přístroje, Чехословакия).
- МАЛДИ-времяпролетный масс-спектрометр Ultraflex TOF-TOF (Bruker Daltonik GmbH, Германия), оснащенный УФ-лазером (337 нм).
- Микробиологическая качалка Model 3525 (Lab-Line Instruments, США).
- Микроинъектор Eppendorf 5242 (Германия).
- Осциллограф PM 3200X 0-10 МГц (Philips, Голландия).
- Перистальтический насос 2120 Varioprepex® II Pump (LKB Bromma, Швеция).
- Прибор для горизонтального электрофореза Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad, США) с источником питания Model 3000Xi (Bio-Rad, США).
- Система гель-документирования CN-TFX Darkroom (Vilber Lourmat, Франция).
- Спектрофотометр планшетный 2103 EnVision™ Multilabel Plate Readers с программным обеспечением Wallac EnVision™ Manager (PerkinElmer, США).
- Спектрофотометр планшетный со встроенной автоматической системой дозирования жидкости NOVOstar (BMG LABTECH, Германия).
- Спектрофотометр UV-1800 (Shimadzu Corp., Япония).
- Термостат BT 120 (Laboratorní přístroje, Чехословакия).
- Термостат Thermomixer Compact (Eppendorf, Германия).
- Ультразвуковой дезинтегратор Model CPX 750, CV33 (Cole-Parmer Instruments, США).
- Ультра-хромато-масс-спектрометрическая система: модуль разделения 1290 Infinity (Agilent, США) и масс-спектрометр с электроспреем 6540 Q-TOF-ESI (Agilent, США).
- Усилитель GeneClamp500 (Axon Instruments, США) и аналого-цифровой преобразователь (АЦП) L780 (LCard, Россия) для оцифровки данных.
- Флуоресцентный микроскоп Olympus IX71 (Olympus, Япония), оснащенный монохромной камеры XM10 с программным обеспечением для обработки изображений Cell A (Olympus, Япония).

- Установка для изучения поведения грызуном TSE Multi Conditioning System Extended Advanced с модулем TSE ActiMot (Activity & Hole Board Measurement System) на арене «Open field» (TSE Systems, Inc., США).
- Хромато-масс-спектрометрическая система: модуль разделения Alliance 2690 LC (Waters, США), фотодиодный детектор PDA 2998 (Waters, США), квадрупольный масс-анализатор с электроспреей ионизацией ESI-MS Micromass ZQ (Waters, США).
- Хроматографическая система высокого давления Breeze™ 2 HPLC System, включающая в себя 1525 Binary HPLC насос и 2489 UV/Visible детектор (Waters Corporation, США).
- Центрифуги 5424, 5804R, 5417R (Eppendorf, Германия).
- Электропоратор Electroporator 2510 (Eppendorf, Германия).
- ЯМР-спектрометр Bruker Avance III 600 MHz, оснащенный тройным резонансным криогенным зондом.

3.2. Методы

3.2.1. Получение и подготовка образцов ядов актиний

Особь актиний, принадлежащие видам *Metridium senile* и *Urticina eques*, были выловлены дайверами на побережье Тромсе, Норвегия в конце лета, начале осени 2012 года. Морские анемоны содержались в проточной морской воде при температуре 4-12°C в течение нескольких недель. Яд собирали у живых особей, используя электростимуляцию (160/300 мА, 10 Гц), после чего выделившуюся слизь смывали раствором 10 мМ этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) и 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ). Полученный раствор центрифугировали и супернатант обессоливали с помощью твердофазной экстракции на обращенной фазе (SPE). Надосадочную жидкость наносили на картридж Sep-Pak C₁₈ Vac/5000 мг (Waters, США), установленный в вакуумный коллектор CHROMABOND® (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Германия) и уравновешенный буфером А (0,1% трифторуксусная кислота (ТФУ)). После нанесения супернатанта колонку промывали раствором А и элюировали связавшийся материал раствором Б (70% ацетонитрил (CH₃CN) в 0,1%

ТФУ). Собранный элюат концентрировали на роторном испарителе и лиофилизовали для последующего хранения при -20°C .

3.2.2. Выделение активных компонентов из ядов актиний

Разделение ядов осуществляли, используя метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ). На первой стадии перерастворенные в буфере А яды наносили на колонку Jupiter C₅ (300 Å, 10 мкм, 250×10 мм, Phenomenex, США) и элюировали в линейном градиенте CH₃CN (0-60% за 60 мин) в присутствии 0,1% ТФУ с постоянной скоростью потока 5 мл/мин. Полученные фракции высушивали на роторном испарителе и перерастворяли в дистиллированной воде перед тестированием биологической активности. Методом масс-спектрометрии проверяли чистоту активных фракций. В случае мультикомпонентного состава фракций, проводили вторую стадию разделения на колонке Synergi Fusion-RP (80 Å, 4 мкм, 250×3 мм, Phenomenex, США), используя линейный градиент CH₃CN (0-30% за 1 мин, 30-50% за 30 мин) в присутствии 0,1% ТФУ с постоянной скоростью потока 0,5 мл/мин.

3.2.3. Масс-спектрометрический анализ (МС)

Определение чистоты образцов проводили методом ВЭЖХ, с использованием фотодиодной матрицы и масс-спектрометрии с электроспреем (LC-PDA-ESI-MS). Система состояла из модуля разделения Alliance 2690 (Waters, США), фотодиодного детектора PDA 2998 (Waters, США) с диапазоном длин волн 190-500 нм и шагом 1,2 нм, а также квадрупольного масс-анализатора Micromass ZQ с электроспреем ионизацией (Waters, США). Перерастворенные в воде образцы разделяли методом ВЭЖХ на колонке Sunfire C₁₈ (100 Å, 5 мкм, 100×2,1 мм, Waters, США) в линейном градиенте ацетонитрила (5-50%) и 0,05% ТФУ с постоянной скоростью потока 0,2 мл/мин. МС анализ проводился в положительном диапазоне, напряжение на конусе составило 30 В. Газ N₂ был использован для десольвации (1000 л/ч) и в конусе (50 л/ч). Обнаружение проводили в непрерывном режиме. Сканирующий диапазон *m/z* составил 100-2000. Запись сигналов проводилась с помощью программного обеспечения MassLynx v4.1 (Waters, США). Серия многозарядных протонированных молекулярных ионов,

полученных сканированием, использовалась для расчета не протонированных средних молекулярных масс.

Определение точных молекулярных масс проводили методом масс-спектрометрии высокого разрешения (система ультра-ВЭЖХ 1290 Infinity (Agilent, США) и масс-спектрометр с электроспреем 6540 Q-TOF-ESI (Agilent, США) под контролем программного обеспечения MassHunter (Agilent, США)) (HR-ESI-MS). Разделение проводили в линейном градиенте ацетонитрила (5-60%) в присутствии 0,1% муравьиной кислоты с постоянной скоростью потока 0,4 мл/мин и при температуре 40°C. МС анализ проводился в положительном диапазоне при частоте 2 ГГц, скорости потока осушающего газа (N₂) – 8 л/мин, давление (N₂) на распылителе – 35 psi, напряжении на капилляре – 3500 V, напряжении на фрагменторе - 175 V и потенциале на скиммере – 65 V. Сканирующий диапазон *m/z* составил 50-3200. Контрольные массы 121,050873 и 922,009798 Да.

Измерение молекулярных масс также проводилось с помощью МАЛДИ времяпролетной спектрометрии на приборе Ultraflex TOF-TOF (Burker Daltonik, Германия). Калибровку проводили с использованием набора стандартов ProteoMass peptide and protein MALDI-MS calibration kit (диапазон молекулярных масс 700–66000 Да) или набора ProteoMass peptide MALDI-MS calibration kit (700–3500 Да) (Sigma-Aldrich, США). Анализ молекулярных масс проводился в положительном линейном или рефлекторном режимах. Образцы смешивали в равном количестве с матрицей – 2,5-дигидроксибензойной кислотой (10 мг/мл в 70% CH₃CN с 0,1% ТФУ, v/v) или α-циано-4-гидроксикоричной кислотой (10 мг/мл в 50% CH₃CN с 0,1% ТФУ, v/v), – и высушивали на воздухе перед измерением. Запись сигналов проводилась с помощью программного обеспечения Bruker DataAnalysis for TOF (Burker Daltonik, Германия).

3.2.4. Восстановление дисульфидных связей и алкилирование SH-групп

Образцы лиофилизированных полипептидов растворяли в 40 мкл денатурирующего буфера (100 мМ Трис-НСl, рН 8, 6М гуанидин хлорид, 3 мМ ЭДТА), добавляли 2 мкл 1,4-дителиотреитола (ДТТ, 1,2 М) (Sigma-Aldrich, США) и инкубировали 4 ч при 40°C до полного восстановления всех дисульфидных связей. Восстановленные SH-группы алкилировали 2 мкл 4-винилпиридина (50% раствора в метаноле) (Sigma-Aldrich, США)

при комнатной температуре в течении 15 мин. Модифицированные пептиды разводили в 300-500 мкл 0,1% ТФУ и немедленно отделяли от восстанавливающих и алкилирующих агентов методом ОФ-ВЭЖФ на колонке Luna C₁₈ (100 Å, 3 мкм, 150×3 мм, Phenomenex, США), используя линейный градиент CH₃CN (10-50% за 40 мин) в присутствии 0,1% ТФУ и при постоянной скорости потока 0,3 мл/мин.

3.2.5. Анализ аминокислотной последовательности

Определение аминокислотной последовательности алкилированных пептидов методом деградации по Эдману проводили на автоматических белковых секвенаторах Procise model 492 (Applied Biosystems, США) в соответствии с рекомендациями производителей. Белковые последовательности доступны в базе данных UniProt Protein Database (C0HK13 – пептид τ-AnmTx Ms 9a-1 из *M. senile*; C0HK26 – пептид τ-AnmTx Ueq 12-1 из *U. eques*).

3.2.6. Определение нуклеотидной последовательности предшественников

Тотальная РНК была получена из щупалец актиний *M. senile* и *U. eques* с помощью TRIzol[®] реагента (Ambion, Канада) согласно протоколам производителя. Обратную транскрипцию кДНК на матрице РНК осуществляли, используя набор реагентов MINT kit (Евроген, Россия), следуя рекомендациям производителя. Определение 3'-концевой последовательности методом ПЦР (полимеразная цепная реакция), или 3'-RACE (rapid amplification of cDNA ends), проводили используя универсальный праймер T7cap и вырожденные праймеры MS-d1 или MS-d2 для *M. senile*, и UE-d1 или UE-d2 для *U. eques* (табл. 2). 5'-RACE осуществляли с помощью T7cap и обратных праймеров MS-r1/MS-r2 и UE-r1/UE-r2 специфичных последовательностям предшественников из *M. senile* и *U. eques* соответственно. Фрагменты ДНК, полученный в результате ПЦР, были клонированы в вектор pAL-TA (Евроген, Россия) и отсекуены с помощью ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, США).

Полные последовательности предшественников из *M. senile* были синтезированы методом ПЦР со специфичных праймеров MS-5'-end и MS-3'-end.

Последовательности кДНК представлены в базе данных EMBL Nucleotide Sequence Database (LT577947 и LT577948 – предшественники пептида τ -AnmTX Ms 9a-1 из *M. Senile*; LT600337 – предшественник пептида τ -AnmTx Ueq 12-1 из *U. eques*).

Таблица 2. Олигонуклеотидные праймеры для определения последовательностей предшественников методом ПЦР.

Название праймера	5' – нуклеотидная последовательность – 3'
T7cap	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAA GCA GTG GTA ACA ACG CAG AGT
MS-d1	GTA GGA GGN TGY ATH AAR TGY CA
MS-d2	GGT CGA TGT GTG AGN ATH GTN GG
UE-d1	TGC TAC CCA GGA CAR CCN GGN TG
UE-d2	GTC CGA AYT AYT GYG ARG GNG C
MS-r1	ACA GCC GGC GAT ACG AAC ACA
MS-r2	CCA TTG GAA TCT TGT GTA TGA C
UE-r1	CAA GCA CAG CAG CAT CTA TCT
UE-r2	AGC TAA AGT GCA CTA GCC GCA
MS-5'-end	GTC AAC TGA GAC CTA CAA CAC
MS-3'-end	CAA TTA TGA ATG GTT ATA GAT CCC

3.2.7. Синтез генов, кодирующих пептиды

ДНК последовательности, кодирующие пептид τ -AnmTX Ms 9a-1 (Ms 9a-1) из яда актинии *M. senile* и пептид τ -AnmTx Ueq 12-1 (Ueq 12-1) из *U. eques*, были синтезированы методом ПЦР из четырёх синтетических олигонуклеотидных праймеров (табл. 3). Праймеры MS/UE-dir1 содержали метиониновый кодон для дальнейшего отщепления бромцианом (BrCN) тиоредоксина, закодированного в плазмидном векторе, от целевого белка (рис. 19). После очистки с помощью гель-электрофореза амплифицированные ПЦР-фрагменты были клонированы по тупым концам в экспрессионный вектор pET32b+ (Novagen, США), линейризованный ферментом рестрикции EcoRV (Fermentas, Литва).

Таблица 3. Олигонуклеотидные праймеры для синтеза генов методом ПЦР.

Название праймера	5' – нуклеотидная последовательность – 3'
Для пептида τ -AnmTX Ms 9a-1 (Ms 9a-1) из яда актинии <i>M. senile</i>	
MS-dir1	TAG AAT TCA TGA ATA TTA TTG TGG GCG GCT GCA TTA AAT G
MS-dir2	GGG CGG CTG CAT TAA ATG CCA TGT GAA AAA TGC GTC CGG CCG TTG
MS-rev1	GAC TCG AGC TAG GAA AAC AGA TCC GGC ACT TTA TCC ACG CCG CA
MS-rev2	CAC TTT ATC CAC GCC GCA GCC CAC AAT ACG CAC GCA ACG GCC GGA CGC AT
Для пептида τ -AnmTx Ueq 12-1 (Ueq 12-1) из яда актинии <i>U. eques</i>	
UE-dir1	GAA GAT CTA TGT GCT ATC CGG GCC AGC CGG GCT GCG GCC ATT GCT CCC GT
UE-dir2	GCC ATT GCT CCC GTC CGA ATT ATT GCG AAG GCG CGC GTT GCG AAT CCG GC
UE-rev1	GAC TCG AGC TAC GCG CAG CAG CAA CGA TCG CCG GAC GCA TCG CAC CAA TG
UE-rev2	CGC ATC GCA CCA ATG ATC GGA GCC GCA ATC ATG AAA GCC GGA TTC GCA AC

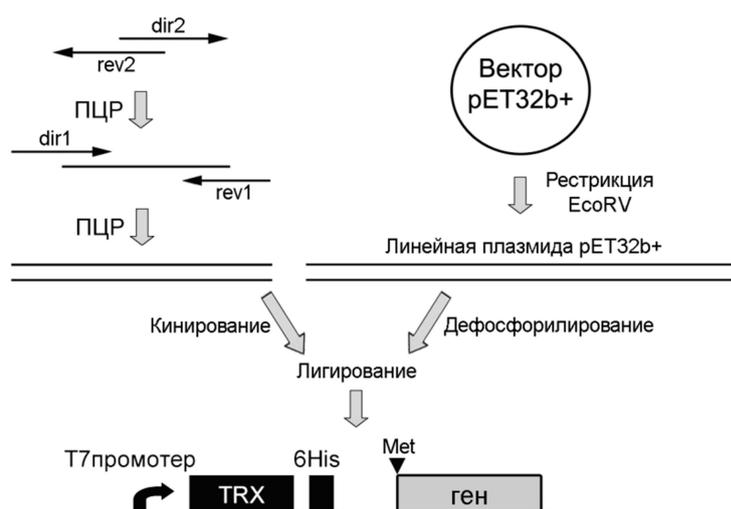


Рисунок 19. Схема сборки ДНК-конструкта для экспрессии рекомбинантных аналогов пептидов.

Ген, кодирующий полноразмерный целевой полипептид со стоп кодоном и N-концевым остатком метионина (Met), был синтезирован с помощью ПЦР из коротких олигонуклеотидных праймеров (dir1, dir2, rev1, rev2). Экспрессионный вектор рЕТ32b+ линеаризовали рестриктазой EcoRV. Лигирование проводили по тупым концам.

TRX – ген тиоредоксина; 6His – гексагистидиновая последовательность.

3.2.8. Получение рекомбинантных аналогов пептидов

Для получения рекомбинантных аналогов пептидов с тиоредоксиновым доменом использовали электрокомпетентные штаммы *Escherichia coli*. Компетентные клетки трансформировали экспрессионной конструкцией и культивировали в культуральной среде LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, при 37°C, умеренной аэрации и перемешивании до оптической плотности $OD_{600} \sim 0,6 - 0,8$. Далее для индукции синтеза белка в культуральную среду добавляли изопропил-1-тио- β -D-галактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 0,2 мМ, и клетки инкубировали в течение 18 ч при температуре 25°C, умеренной аэрации и перемешивании. После культивирования клетки осаждали центрифугированием 5 мин при 6000×g и ресуспендировали в буфере для металл-аффинной хроматографии (400 мМ NaCl, 20 мМ Трис-HCl, pH 7,5). Полученную суспензию подвергали ультразвуковой обработке и затем центрифугировали 15 мин при 9000×g, чтобы отделить нерастворимую часть. Супернатант наносили на металл-аффинный сорбент TALON Superflow (Clontech, США), и элюировали с колонки пептид с тиоредоксиновым доменом следуя рекомендациям производителя. Затем очищенный рекомбинантный белок разводили до концентрации 1 мг/мл, добавляли концентрированную HCl до конечной концентрации 0,2 М и 600 моль BrCN (5 М в CH₃CN) на 1 моль белка. Щепление проводили в темноте при комнатной температуре в течение ночи, как описано в статье [303]. Реакционную смесь разделяли с помощью ОФ-ВЭЖХ на колонке Jupiter C₅ (300 Å, 10 мкм, 250×10 мм, Phenomenex, США) в линейном градиенте концентраций CH₃CN (0-60% за 60 мин) в присутствии 0,1% ТФУ с постоянной скоростью потока 5 мл/мин. При необходимости проводили дополнительное разделение на колонке Vydac C₁₈ (300 Å, 5 мкм, 250×4,6 мм, Grace, США), используя линейный градиент CH₃CN (0-40% за 40 мин), в присутствии 0,1% ТФУ с постоянной скоростью потока 1 мл/мин. Чистоту рекомбинантных пептидов проверяли с помощью N-концевого секвенирования и МАЛДИ масс-спектрометрии.

3.2.9. ЯМР-спектроскопия

ЯМР-спектроскопия проводилась к.ф.-м.н. Минеевым К.С., сотрудником лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии под руководством проф. А.С. Арсеньева. Образец рекомбинантного пептида массой 0,8 мг растворяли в 350 мл

буфера, содержащего 5% D₂O, 1 mM азид натрия, pH 3,2. Все спектры измеряли при температуре 303 K с помощью спектрометра Bruker Avance III 600 MHz (Bruker BioSpin, США), оснащенного тройным резонансным криогенным зондом. Резонансные значения ¹H, ¹⁵N и ¹³C были получены с помощью стандартной процедуры [304], основанной на измерении спектров MLEV-TOCSY (80 мс), NOESY (40 мс и 80 мс), ¹H,¹³C-HSQC, ¹H,¹⁵N-HSQC и DQF-COSY. Затем образец лиофилизовали, перерастворили в 350 мл чистого D₂O буфера и измеряли скорость обмена амидных протонов на дейтерий растворителя (спектры NOESY (80 мс) и DQF-COSY).

Расчет пространственной структуры осуществляется алгоритмом «имитации отжига» (simulated annealing) и методом молекулярной динамики, используя программное обеспечение CYANA версии 3.0 (L.A.Systems, Inc., Япония) [305]. Межпротонные расстояния были получены на основании отнесений кросс-пиков в спектрах NOESY ($t_m = 80$ мс). Ограничения на торсионных углах и стереоспецифичность были рассчитаны при анализе констант спин-спинового взаимодействия (J-couplings) и спектров ЯЭО (NOE). Анализ формы кросс-пиков NOESY позволил измерить константы ³J_{HNH α} , а при обработке спектров DQF-COSY рекомбинантного пептида в D₂O (релаксационная задержка 3 с) с помощью программного обеспечения ACME [306] были получены константы ³J_{H α HN β} . Водородные связи определяли исходя из скорости обмена амидных протонов с растворителем, а дисульфидные связи из расчета пространственной структуры.

Визуальный анализ расчетных структур и был выполнен, используя программное обеспечение MOLMOL версии 2k2 [307]. Полученная пространственная структура была проверена и проанализирована с помощью сервера PDB-sum [308]. Анализ гомологии трехмерной структуры выполнен инструментом анализа PDBeFold [309]. Трехмерная карта электростатического потенциала была рассчитана, используя программное обеспечение APDS (www.poissonboltzmann.org). Химические сдвиги, ЯМР ограничения и атомные координаты (10 моделей) были депонированы в базу данных Protein Data Bank (www.pdb.org) (5LAN – код присвоенный пептиду Ueq 12-1).

3.2.10. Биоинформационные методы

Для поиска гомологичных аминокислотных последовательностей пептидов были использованы поисковая система BLAST [310], SRDA [310–312], база данных антимикробных пептидов (Antimicrobial Peptide Database) [313], инструменты InterProScan [314] и StellaBase [315]. Аминокислотные последовательности и информация о пространственных структурах были взяты из банка данных UniProt Data Bank [316]. Аминокислотное выравнивание было построено с помощью модуля Megalign (DNASTAR, Inc., США). Потенциальный сайт щепления сигнального пептида был установлен с помощью сервиса SignalP4.1 [317] (выбраны значения D-отсечки «по умолчанию» и метод «без ТМ областей»). Теоретическая молекулярная масса и значение изоэлектрической точки (pI) были рассчитаны с помощью программного обеспечения ExPASy (<http://us.expasy.org/>), а для анализа моноизотопных масс использовался ChemCalc [318].

3.2.11. Тестирование антимикробной активности

Антибактериальная активность была протестирована на грамположительных и грамотрицательных бактериях: *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032), *Staphylococcus aureus* (ATCC 9144), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) и *Escherichia coli* (ATCC 2592). Все штаммы выращивали при комнатной температуре на среде Mueller Hinton Broth (МНВ; Difco Laboratories, США). Навеску пептида растворяли в воде до концентрации 200 мкМ и готовили серию последовательных разведений в 2 раза (в каждом последующем разведении концентрация пептида в 2 раза меньше, чем в предыдущем). Антибактериальный скрининг и определение минимальной ингибирующей концентрации (МИС) проводили в 96-луночных планшетах для микротитрования, как описано в статье [319]. К фракциям пептида объемом 50 мкл добавляли 50 мкл суспензии активно растущей бактериальной культуры до конечной концентрации $1,3 - 1,5 \times 10^4$ бактерий/мл. Бактериальный рост анализировали каждый час, измеряя оптическую плотность (OD₅₉₅) с помощью планшетного спектрофотометра 2103 EnVision™ Multilabel Plate Readers с программным обеспечением Wallac EnVision™ Manager (PerkinElmer, США). Значение МИС было определено как самая

низкая концентрация пептида, ингибирующая бактериальный рост. Тестирование проводили в двух параллелях.

3.2.12. Тестирование активности на TRPA1 рецепторе

Ген TRPA1 (AY496961.1) был получен из крысиного мозга, клонирован в вектор pсDNA4/ТО и отсекуенирован.

3.2.12.1. Кальциевый имиджинг на клетках СНО

Линия клеток СНО (Chinese Hamster Ovary - яичник китайского хомячка), стабильно экспрессирующая крысиный TRPA1 (rTRPA1) рецептор, была получена с использованием системы T-Rex System (Thermo Fisher Scientific Inc., США) в соответствии с протоколом производителя. Кодированная ген TRPA1 кДНК была клонирована в вектор pсDNA4/ТО, который позволяет осуществлять индуцируемую экспрессию в клетках млекопитающих. Полученной конструкцией трансфицировали клетки СНО, несущие регуляторный вектор pсDNA6/TR, который кодирует тетрациклиновый репрессор. Клетки СНО культивировали в среде DMEM/F12 (1:1), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, при температуре 37°C и 5% CO₂. Отбор клонов проводили на среде, содержащей 5 мкг/мл бластицидина и 250 мкг/мл зеоцина, в течение двух недель. Скрининг одиночных колоний проводили с помощью анализа агонист-индуцируемого поглощения [Ca²⁺]. Экспрессия TRPA1 индуцировали добавлением тетрациклина до конечной концентрации 1 мкг/мл за 24 часа до начала тестирования. Положительные клоны использовались для дальнейших экспериментов (рис. 20). Флуоресцентный анализ проводили с помощью планшетного спектрофотометра со встроенной автоматической системой дозирования жидкости NOVOstar (BMG LABTECH, Германия). Клетки, несущие плазмиду с rTRPA1, высевали на черные прозрачные 96-луночные планшеты в концентрации 75000 клеток на лунку и культивировали в течение ночи при температуре 37°C (среда без бластицидина и зеоцина, содержащая 1 мкг/мл тетрациклина). TRPA1-экспрессирующие клетки окрашивали цитоплазматическим кальциевым индикатором Fluo-4AM с помощью набора Fluo-4 Direct™ (Thermo Fisher Scientific Inc., США) и инкубировали в темноте 1 час при температуре 37°C, и затем 1 час при 25°C. Измерения проводились немедленно после добавления к клеткам контроля (буфер) и серии последовательных разведений

пептида. Флуоресцентные сигналы ($\lambda_{ex} = 485$ нм, $\lambda_{em} = 520$ нм) контролировали до и после добавления агониста TRPA1. Измерения проводили при комнатной температуре и pH 7,4.

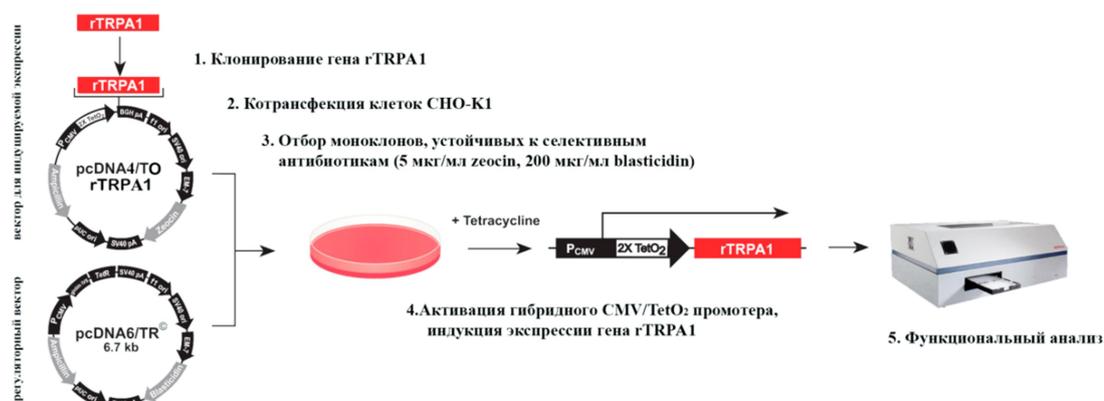


Рисунок 20. Схема создания стабильной линии клеток CHO, экспрессирующих рецептор rTRPA1.

3.2.12.2. Кальциевый имиджинг на DRG нейронах

Уход за животными и эксперименты над ними проводились по протоколу, утвержденному Комитетом по уходу и использованию животных Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (протокол 191/2015). Использовали взрослых 3 месячных крыс Wistar. Животные содержались в условиях 12:12-часового цикла день-ночь и свободного доступа к пище и воде. Перед вырезанием DRG нейронов из сегментов T1-L5, крыс анестезировали посредством ингаляционного наркоза изофлураном (Baxter Healthcare Corp., США).

Культивирование выполнялось согласно ранее описанному протоколу [320] с некоторыми модификациями. Изолированные DRG нейроны инкубировали с коллагеназой типа 1 (2 мг/мл) и диспазой II (2 мг/мл) (Sigma-Aldrich, США) в не содержащем магния и кальция сбалансированном солевом растворе Хэнкса (Paneco, Россия) в течение 15 мин при температуре 37°C, и затем ганглии диссоциировали путем их растирания стеклянной пипеткой Пастера. Эту стадию повторяли 3 раза, далее клетки промывали центрифугированием (3 раза при 1000×g в течение 2 мин) в среде L15 (Sigma-Aldrich, США), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки. После промывки клетки суспендировали в базальной среде TNB-100, содержащей липид-белковый комплекс (Biochrom AG, Germany) и 25 мкМ цитозин-β-D-арабинофуранозида (Sigma-

Aldrich, США). Клеточную суспензию переносили на 96-луночные планшеты, покрытые поли-D-лизином/ламинином (Sigma-Aldrich, США), из расчета 0,5-1 ганглия на лунку, и культивировали в течение 20-24 ч в CO₂ инкубаторе.

Измерение внутриклеточной концентрации кальция ($[Ca^{2+}]_i$) проводили на первичной культуре DRG нейронов в буфере ECS (extracellular solution – внеклеточный раствор), содержащем 140 mM NaCl, 2,8 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 20 mM HEPES (4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоновая кислота), 10 mM D-глюкозы, pH 7,4, при комнатной температуре. Клетки инкубировали с кальциевым индикатором Fluo-4AM (2 мкМ) и пробенацидом (1,25 мМ; ингибирует клеточный транспорт) (Invitrogen, США) в ECS буфере в течение 30 мин при температуре 37°C, а затем 30 мин при комнатной температуре в темноте. Возбуждение Fluo-4 проводили при длинах волн 460-495 нм, а флуоресценцию измеряли при 510-550 нм с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus IX71 (Olympus, Япония). Индивидуальные клеточные ответы регистрировали с помощью монохромной камеры XM10 и программного обеспечения для обработки изображений Cell A (Olympus, Япония), а изменение уровня флуоресценции анализировали, используя программное обеспечение ImageJ (National Institutes of Health (NIH), США). Каждую клетку исследовали независимо, и интенсивность флуоресценции в начале эксперимента считали равной 100%. В каждом эксперименте клетки подвергали воздействию ECS-буфера, TRPA1 агониста АИТС (75 мкМ; аллиллизотиоцианат), пептида (300 нМ) и капсаицина (0,5 мкМ). Чтобы исключить возможность влияния механического воздействия на DRG нейроны, использовали буфер вместо пептида или за буфером следовали АИТС и капсаицин. Для демонстрации того, что пептид не влияет на клетки, его применяли перед использованием агониста и капсаицина. Все лиганды, кроме пептида, были приобретены у Sigma-Aldrich (США).

3.2.12.3. Электрофизиологическое тестирование

РНК, кодирующая крысиный TRPA1 (AY496961.1), была синтезирована на матрице плазмиды pVAX1/TRPA1, линеаризованной рестриктазой NarI, с помощью набора HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit (New England Biolabs, США), следуя рекомендациям производителя для 5'-кэпированных транскриптов. Ооциты лягушки *Xenopus laevis* обрабатывали коллагеназой (1 мг/мл) в стерильном безкальциевом растворе ND-96 (100 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7,4) при

комнатной температуре и перемешивании в течение 120 мин для растворения фолликулярной оболочки. Транскрипты кРНК (2-5 нг) вводили в дефолликулированные ооциты *X. laevis*. Инъецированные ооциты инкубировали в течение 2-7 дней при температуре 15-19°C в стерильной среде ND-96 (100 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 1,8 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 5 мМ HEPES, pH 7,4), содержащей 50 мкг/мл гентамицина.

Электрофизиологические измерения проводили в ванне с ламинарным потоком безкальциевого раствора ND-96 при комнатной температуре (22-24°C). Ооциты прокалывали двумя стеклянными микроэлектродами, которые были заполненными 3 М KCl и соединены с усилителем GeneClamp 500 (Axon Instruments, США). Мембранный потенциал удерживали на -20 мВ, и осуществляли запись входящих/исходящих токов, которые вызывает повторяющееся каждые 4 с ступенчатое изменение потенциала до -100/-80 мВ, удерживаемое в течение 80 мс, с последующим линейным возрастанием напряжения от -100/-80 мВ до +100/+80 мВ в течение 200 мс. Для записи исходящих токов потенциал мембраны удерживали на -20 мВ и каждые 4 с ступенчато изменяли напряжение до +80 мВ, которое удерживали в течение 200 мс. Канал активировали с помощью диклофенака (300 мкМ в безкальциевом ND-96) [148] или аллилизотиоцианата (АИТС, 100 мкМ в безкальциевом ND-96) [245]. Измерения проводили при частоте 20 Гц, а оцифровку данных осуществляли на частоте 100 Гц с помощью АД-преобразователя L780 (LCard, Россия), используя программное обеспечение собственного производства.

Для анализа полученных данных использовалось четырехпараметрическое логистическое уравнение $F(x)=A_2+(A_1-A_2)/(1+(x/x_0)^p)$, где x - концентрация пептида, $F(x)$ - значение ответа при данной концентрации пептида, A_2 - максимальное значение ответа (% контроля), A_1 - контрольное значение ответа (зафиксировано на 100%), x_0 - значение EC₅₀, p - коэффициент Хилла (n_H , коэффициент наклона кривой).

3.2.13. Тестирование на животных моделях

Все эксперименты были одобрены Комитетом по уходу и использованию животных филиала ИБХ РАН в г. Пущино, Россия (протокол № 492/16). Взрослые самцы мышей CD-1 (20-30 г; получены в Отделе животноводства Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,

Пушино, Россия) содержались при комнатной температуре ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) и в условиях 12:12-часового цикла день-ночь с пищей и водой в свободном доступе. Каждое животное использовалось один раз, и было помещено в CO_2 камеру для эвтаназии сразу после завершения эксперимента. Пептиды растворяли в физиологическом растворе. Полученные данные обрабатывались методом дисперсионного анализа (ANOVA - ANalysis Of VAriance) и с помощью теста Тьюки (Turkey's posthoc test). Данные представлены в виде средних величин \pm S.D. Во всех ноцицептивных и поведенческих тестах ответы регистрировались лицом, не имеющим информации об исследуемом веществе (контроль или пептид). Поскольку в ходе экспериментов были получены значимые результаты, никакие другие животные не умерщвлялись.

3.2.13.1. Анализ болевого поведения, вызываемого веществом

Пептиды (2,5 мкг/10 мкл) или физиологический раствор (10 мкл) вводили мышам в левую заднюю лапу. Облизывание лапы и защитное поведение контролировали в течение 15 минут после инъекции. Через 2 часа после инъекции у мышей измеряли время отдергивания соответствующей лапы от горячей пластины (53°C).

3.2.13.2. Тест «Открытое поле» для изучения поведения мышей

Влияние пептидов на поведение мышей оценивали с помощью установки TSE Multi Conditioning System Extended Advanced с модулем TSE ActiMot (Activity & Hole Board Measurement System) на арене «Open field» (TSE Systems, Inc., США). Локомоторную активность регистрировали в течение 15 мин. Пептиды Ms 9a-1 (0,3 мг/кг) или Ueq 12-1 (0,2 мг/кг) или физиологический раствор вводили внутривенно за 30 минут до тестирования.

3.2.13.3. АИТС-индуцируемое ноцицептивное поведение

Для активации периферических рецепторов TRPA1 и индукции ноцицептивного поведения у мышей использовали агонист TRPA1 аллилизотиоцианат (АИТС) [278]. В подошву задней левой лапы вводили 20 мкл АИТС (0,5% в физиологическом растворе). Пептиды Ms 9a-1 (0,3 мг/кг) или Ueq 12-1 (0,2 мг/кг) или физиологический раствор вводили внутривенно за 30 мин до АИТС. Регистрировали длительность поджатия лапы и количество облизываний в течение 5 минут после инъекции агониста. Диаметр лапы

оценивали перед тестом и через 2, 4 и 24 часа после инъекции АИТС с помощью электронного цифрового штангенциркуля.

3.2.13.4. CFA-индуцируемое воспаление и тепловая гипералгезия

Воспаление лапы и термическую гипералгезию индуцировали с помощью полного адьюванта Фрейнда (CFA; в эмульсии масло/физиологический раствор (1:1)). Мышам в подошву задней левой лапы вводили 20 мкл CFA. Контрольным мышам вводили 20 мкл физиологического раствора. Через 24 ч мышам делали внутривенную инъекцию пептидов Ms 9a-1 (0,03 или 0,3 мг/кг) или Ueq 12-1 (0,2 мг/кг или 1 мг/кг) или физиологического раствора. Спустя 30 минут регистрировали длительность задержки лапы перед отдергиванием от горячей пластины (53°C). Диаметр лапы оценивали перед инъекцией CFA, до введения пептидов или физиологического раствора, и далее через 2, 4 и 24 часа с помощью электронного цифрового штангенциркуля. Процент воспаления рассчитывали по формуле ((диаметр после введения пептида - диаметр перед CFA)/(диаметр после CFA - диаметр перед CFA))×100. Антагонист TRPA1 A-967079 (Sigma-Aldrich, США) растворяли в 85% PEG400 и вводили перорально (20 мг/кг).

3.2.13.5. Капсаициновый тест

Инъекцию капсаицина (3 мкг/10 мкл смеси этанол/физиологический раствор (1:9)) вводили в подошву задней лапы мыши, чтобы вызвать острую боль. Сразу после инъекции мышей помещали в стеклянные цилиндры и наблюдали за ними в течение 15 мин. Фиксировали длительность облизывания инъецированной лапы.

4. Результаты и обсуждения

В данной работе были выделены пептиды Ms 9a-1 (из яда морской анемоны *M. senile*) и Ueq 12-1 (из яда актинии *U. eques*). Оба пептида обладают потенцирующим действием на активированный агонистом крысиный TRPA1, и оказывают обезболивающий эффект при воспалительных процессах. Ms 9a-1 и Ueq 12-1 является первыми полипептидными молекулами, которые потенцируют рецептор TRPA1.

Морские анемоны продуцируют множество биологически активных пептидов с различной линейной и пространственной структурой. Многие из этих пептидов являются перспективными молекулами для создания лекарственных препаратов на их основе [321]. Актинии продуцируют белки и пептиды, в основном, являющиеся цитолитиками или нейротоксинами, которые действуют на множество различных молекулярных мишеней. В яде морских анемонов можно были обнаружены токсины, влияющие на активность потенциал-чувствительных Na^+ -, K^+ -, кислото-чувствительных (ASIC) ионных каналов, цитолизины, ингибиторы протеаз Kunitz типа и белки, обладающие фосфолипазной (A2) активностью [321,322].

4.1. Выделение пептидных модуляторов из ядов морских анемонов и установление их структуры

Морских анемонов *M. senile* и *U. eques* собирали у побережья города Тромсе, Норвегия, и путем электрической стимуляции получали эктодермальные секреты и слизь. Выделенный экссудат, содержащий пептиды и другие гидрофобные компоненты, обессоливали и концентрировали с помощью твердофазной экстракции (SPE).

4.1.1 Полипептид из яда актинии *Metridium senile*

Фракция яда актинии *M. senile* после SPE потенцировала активацию TRPA1 агонистом при анализе изменения флуоресцентного сигнала на стабильной линии клеток CHO, экспрессирующих рецептор rTRPA1, в ответ на увеличение

внутриклеточной концентрации кальция. Активное соединение выделяли в две стадии, используя ОФ-ВЭЖХ (рис. 21), тестирование активности полученных фракций проводили с помощью кальциевого имиджинга на клетках CHO-rTRPA1. Молекулярная масса активного пептида, которая составила 3654,4 Да, была определена с помощью МАЛДИ масс-спектрометрии.

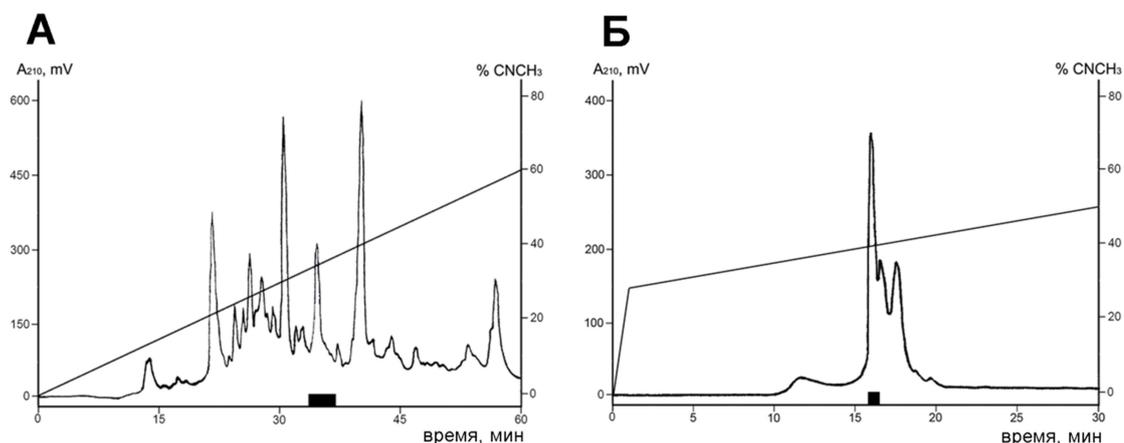


Рисунок 21. Выделение активного пептида из яда актинии *M. senile*. **А.** Разделение неочищенной пептидной фракции методом ОФ-ВЭЖХ на колонке Jupiter C₅ (250×10 мм), используя линейный градиент концентраций CH₃CN (0-60% за 60 мин) в присутствии 0,1% ТФУ с постоянной скорости потока 5 мл/мин. **Б.** Второе разделение активной фракции методом ОФ-ВЭЖХ на колонке Synergi Fusion-RP (250×3 мм) с помощью линейного градиента концентраций CH₃CN (0-30% в течение 1 мин, 30-50% за 30 мин) в присутствии 0,1% ТФА с постоянной скоростью потока 0,5 мл/мин. Фракции, обладающие потенцирующей активностью на агонист-активированный rTRPA1, отмечены черным прямоугольником.

N-концевая последовательность, состоящая из 34 аминокислотных остатков, была установлена методом деградацией по Эдману. Исходя из разности между рассчитанной молекулярной массой секвенированного фрагмента и молекулярной массой пептида, измеренной с помощью МАЛДИ, предположили наличие остатка Ser на C-конце пептида. Первичную структуру подтвердил анализ кодирующей пептид кДНК, которая была получены с помощью метода быстрой амплификации 3'- и 5'-концов ДНК (RACE). Используя тотальную РНК *M. senile* в качестве матрицы, универсальный праймер T7Cap и вырожденные праймеры MS-d1 и MS-d2, методом 3'-RACE получили ПЦР продукт

размером ~250 п.о. Фрагмент ДНК, кодирующий сигнальный пептид и 5'-нетранслируемую область, амплифицировали методом 5'-RACE с использованием универсального праймера T7Cap и обратных праймеров MS-r1 и MS-r2. Полную ДНК последовательность, кодирующую предшественник пептида, получали методом ПЦР с помощью праймеров MS-5'-end и MS-3'-end. В результате секвенирования полученных клонов было найдено два гена, ms9.1 и ms9.2, которые кодируют белки-предшественники MS9.1 и MS9.2, содержащие целевой пептид (рис. 22, А и Б). Рассчитанная средняя молекулярная масса (3654,4 Да) была равна измеренной молекулярной массе нативного пептида.

Белки-предшественники содержат одинаковый сигнальный пептид, спейсерную последовательность, активный пептид и его структурные гомологи, и различаются между собой несколькими аминокислотными остатками в С-концевой области (рис. 22 Б). Активный пептид, состоящий из 35 а.о., расположен между спейсерным участком после сигнальной последовательности и структурным гомологом. Поиск гомологичных аминокислотных последовательностей с помощью программы BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) обнаружил сходство мотива распределения цистеинов в полипептидной цепи пептида из яда *M. senile* с положением цистеинов в некоторых пептидах морских анемонов: U-SHTX-Sdd1 [323], Vcg-III-23.41 [324] и SHTX-1/SHTX-2 [325] (рис. 22 В). Найденные пептиды содержат два дисульфидных мостика и относятся к группе 9a пептидов морских анемонов в соответствии с номенклатурой [326], поэтому пептид из яда *M. senile* был назван τ -AnmTX Ms 9a-1 (сокращенно Ms 9a-1).

С-концевые гомологи из предшественников MS9.1 и MS9.2 получили названия AnmTX Ms 9a-2 (Ms 9a-2) и AnmTX Ms 9a-3 (Ms 9a-3) соответственно. Пептиды Ms 9a-1, Ms 9a-2 и Ms 9a-3 фланкированы последовательностью DP (EP) (рис. 22, А и Б), которая является стандартным сайтом процессинга в токсинах морских анемонов, перепончатокрылых и амфибий [327]. В процессе созревания белков такие последовательности могут быть удалены дипептидилпептидазами.

Трехмерная структура пептидов группы 9a изучена на примере токсина Ugr 9a-1, выделенного из яда актинии *U. grebelnyi* [328]. Пептид Ugr 9a-1 образует в пространстве скрученную β -шпильку, которая не стабилизирована межтяжевыми дисульфидными связями. Пептиды группы 9a действуют на разные клеточной мишени: Vcg-III-23.41 и SHTX-1/SHTX-2 являются слабыми блокаторами калиевых каналов [324,325]; Ugr 9a-1

ингибирует каналы ASIC3, что вызывает значительный анальгетический эффект [328]; U-SHTX-Sdd1, мишень которого еще не известна, является первым найденным токсином актиний с посттрансляционной модификацией O-HexNAc треонина в первом положении [323]. Все эти пептиды не имеют значительного сходства аминокислотной последовательности с первичной структурой Ms 9a-1 (максимум 34% идентичности). Наиболее близкими гомологами пептида являются Ms 9a-2 и Ms 9a-3, кодируемые генами тех же белков-предшественников, что и Ms 9a-1. Основными отличиями Ms 9a-1 от Ms 9a-2 и Ms 9a-3 являются длинный C-конец и негомологичная область между 2 и 3 остатками цистеина (рис. 22 В). Возможно, именно эти негомологичные участки частично отвечают за связывание пептида с рецептором.

Пока список полипептидных молекул, модулирующих рецептор TRPA1, был ограничен только токсином сконструированным на основе пептида (35 а.о.) из яда перуанского тарантула *Thrixopelma pruriens*, t-ProTx-I (W5A), который также ингибирует $Na_v1.2$ [24], и пептидом Ph α 1 β (55 а.о.) из яда бразильского странствующего паука *Phoneutria nigriventer*, который обратимо ингибирует потенциал-чувствительные кальциевые каналы (VGCC) и является антагонистом TRPA1 [295]. Ms 9a-1 не имеет какой-либо гомологии с этими пептидами, он обладает β -шпилечной структурой, характерной для токсинов морских анемонов группы 9a [328]. Все пептиды этой группы экспрессируются в виде сложных белков-предшественников. Производство сложных прекурсоров является эффективным способом интенсивной экспрессии коротких пептидов у животных и растений [328,329]. Среди животных токсинов наиболее ярким примером является экспрессия пептида Am-1, который обладает слабой летальной активностью в отношении крабов (LD_{50} 830 г/кг), а его предшественник содержит 6 копий токсина Am-1 [330].

Пептид Ms 9a-1 отличается от своих гомологов (рис. 22 В) более длинным C-концом, который, вероятно, появились из-за мутации сайта узнавания дипептидилпептидазы (DP или EP). Такая мутация может быть причиной появления потенцирующей активности на TRPA1, но для подтверждения этого предположения необходимы дальнейшие эксперименты. Поскольку структура TRPA1 была недавно определена с помощью электронной криомикроскопии [63], Ms 9a-1 может стать основой для выполнения молекулярного докинга, мутагенеза и конструирования миметиков, модулирующих рецептор.

A

DNA: gtcaactgagacctacaacactaagacattgatctgaacatgaagcaaagtttgattcttctgctgttttgctcctc
 +1fr: **•M•K•Q•S•L•I•L•A•V•L•C•L•**

DNA: gcactgggttttcgctacaatagaagcgaaccaaagctgatccaacatcattgttggtggctgtattaagtcg
 +1fr: **•A•L•V•F•A•T•I•E•A•K•P•K•A•D•P•N•I•I•V•G•G•C•I•K•C•**

DNA: catgtcaaaaaatgcctctggttagatgtgttcgtatcgttggctgtggagttgataaagttcctgacttattcagt
 +1fr: **•H•V•K•N•A•S•G•R•C•V•R•I•V•G•C•G•V•D•K•V•P•D•L•F•S•**

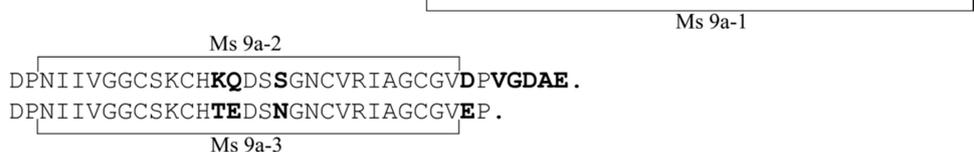
DNA: gatccaacatcattgttggtggctgttctaagtgtcataaacaagattccagtggttaattgtgttcgtatcgcc
 +1fr: **•D•P•N•I•I•V•G•G•C•S•K•C•H•K•Q•D•S•S•G•N•C•V•R•I•A•**

DNA: ggctgtggagttgatcctgtaagagacgctgaataaagagccacatgtgttcctattccaactgcaagtaaact
 +1fr: **•G•C•G•V•D•P•V•R•D•A•E•ter**

DNA: aagaaaagacactaaataacgggatctataaccattcataattgttaattattaagatatcgtaataactgatcg
 DNA: tagttaagatccttaataataacttgaatagtagtttagtttcaatggttttcaatggttatacgtattataa
 DNA: attacatataaatcgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

B

MS9.1 *MKQSLILAVLCLALVFATIEAKPKADPNIIVGGCIKCHVKNASGRCVRIVCGVDKVPDLFS*
 MS9.2 *MKQSLILAVLCLALVFATIEAKPKADPNIIVGGCIKCHVKNASGRCVRIVCGVDKVPDLFS*



B

Ms 9a-1	NIIVGGCIKCHVKNASGRCVRIV-GCGVDKVPDLFS	100%
Ms 9a-2	NIIVGGCSKCHKQDSSGNCVRIA-GCGV	57.14%
Ms 9a-3	NIIVGGCSKCHTEDSNGNCVRIA-GCGV	54.29%
U-SHTX-SDD1	<i>TIIIGAPCRKCEHLDRSGNCVRDWS-CGQEV</i>	34.29%
BcgIII 23.41	NIIDVPCRP CYRDS SGNCVYDQLGCGA	34.29%
SHTX1/2	<i>XIIIGAPCRRCYHSDGKGCVRDWS-CGQQ</i>	28.57%
Ugr 9a-1	<i>ISIDPPCRFCYHRDGSNCVYDAYGCGAV</i>	28.57%
Am-1	NVAVPPCGDCYQQVGNT-CVRVPSLCP	22.86%
<i>Cys-pattern</i>	CxxC.....C.....C	

Рисунок 22. Структура белков-предшественников. **A.** Нуклеотидная последовательность кДНК ms9.1 и соответствующая ей транслированная аминокислотная последовательность. Последовательность сигнального пептида выделена жирным шрифтом, зрелые пептидные последовательности подчеркнуты, пептид Ms 9a-1 выделен серым цветом. **B.** Выравнивание белковых последовательностей предшественников Ms 9a-1, которые кодируют гены ms9.1 и ms9.2. Сигнальные последовательности белков показаны курсивом, а различающиеся аминокислотные остатки выделены жирным шрифтом. **B.** Выравнивание аминокислотных последовательностей трех пептидов *M. senile*, и токсинов морских анемонов, относящихся к структурному классу 9a: пептид U-SHTX-Sdd11 (C0HJB4) из *Homostichanthus duerdeni*; SHTX1/2 (P0C7W7) из *Stichodactyla haddoni*; Bcg III 23,41 (P86466) из *Bunodosoma cangicum*; Am-1 (P69929) от *Antheopsis maculata*; Ugr 9a-1 (S4S1V7) из *Urticina grebelnyi*. Жирным шрифтом выделены аминокислотные остатки, идентичные оным в Ms 9a-1. Внизу показана общая схема распределения и замыкания цистеинов для структурного класса 9a.

4.1.2 Полипептид из яда актинии *Urticina eques*

Экстракт яда морской анемоны *U. eques* после SPE подавлял рост грамположительных бактерий *Corynebacterium glutamicum* (минимальная действующая концентрация 80 мкг/мл). Тот же экстракт ингибировал рецептор TRPA1 (0,1 мг/мл) и не действовал на TRPV1 и TRPV3 при измерении внутриклеточной концентрации кальция на основе флуоресцентного красителя Fluo-4.

Для выделения биологически активных компонентов, экстракт разделяли с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ (рис. 23). Затем все полученные фракции тестировали на наличие антибактериальной активности и на активность по отношению к TRPA1. Фракция, которая элюировалась после 27 минуты, обладала антибактериальным действием против *C. glutamicum* и потенцировала рецептор TRPA1 в кальциевом имиджинге. Другие фракции не проявляли активность по отношению к TRPA1. Причиной того, что экстракт яда до ВЭЖХ ингибировал TRPA1, а хроматографическая фракция обладает противоположным эффектом, вероятно, является наличие в первоначальном образце интерферирующих биологически активных соединений.

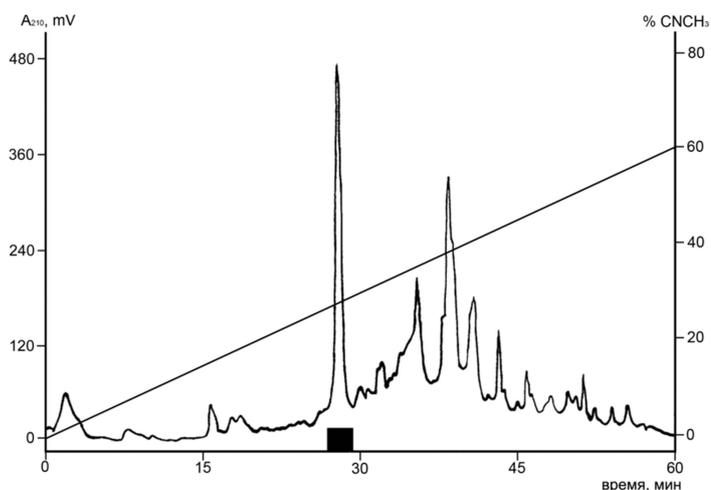


Рисунок 23. Выделение Ueq 12-1 из экстракта яда актинии *U. eques*, используя метод ОФ-ВЭЖХ. Экссудат (после электрической стимуляции и обессоливания) морской анемоны *U. eques* предварительно очищали путем твердофазной экстракции (SPE). Полученный экстракт разделяли с помощью ОФ-ВЭЖХ на колонке Jupiter C₅. Элюирование проводили в линейном градиенте CH₃CN (0-60% за 60 мин) в присутствии 0,1% ТФУ с постоянной скоростью потока 5 мл/мин. Фракция, ингибирующая рост *C. glutamicum* и потенцирующая активность TRPA1, содержит пептид Ueq 12-1 (отмечена черным прямоугольником).

Активная фракция содержала пептида с моноизотопной молекулярной массой 4788,63 Да, измеренной с помощью HR-ESI-MS.

Частичная N-концевая последовательность пептида была определена с помощью метода деградации по Эдману: CYPGQPGCGHCSRPHYCEGARCESGFHDCGSDHW (34 а.о.), и содержала 6 цистеинов.

```
DNA: ttcaagtttcaaatgtgtctggtgatgcttgttttgggagccatgtatgtgcagggttg
+1fr:      •M•C•L•L•M•L•V•L•G•A•M•Y•V•Q•G•W•

DNA: cacagcgccggctttggaaagcggacattgaagaaaagggtgttatcccgccaacccggg
+1fr: •H•S•A•G•F•G•K•R•T•L•K•K•R•C•Y•P•G•Q•P•G•

DNA: tgtggacattgctccagacccaattactgtgagggcgcccggtgtgagtcaggcttcat
+1fr: •C•G•H•C•S•R•P•N•Y•C•E•G•A•R•C•E•S•G•F•H•

DNA: gactgcgggagcgatcactggtgtgacgcacatcgggagatagatgctgctgtgcttgattg
+1fr: •D•C•G•S•D•H•W•C•D•A•S•G•D•R•C•C•C•A•*•

DNA: aaccacttgccgctagtgcacttttagctcgatgggtgagaaaacgatgacagtctcgtcaa
DNA: caagattgacaaaagattgattagtaaaactaaactaaacgggaataaagtaaaagtgtt
DNA: aattcataactgaagactttctttctcaccacgataaacactgttaagtaggactcaatg
DNA: aaatgtaagcagtgaaaaaataaaggctgaatcagcaaaaaaaaaa
```

Рисунок 24. Последовательность ДНК (ENA ID: LT600337), кодирующая белок-предшественник, и соответствующая ей транслированная аминокислотная последовательность. Последовательность сигнального пептида подчеркнута, пропептид показан курсивом, а последовательность зрелого пептида выделена жирным шрифтом. Двойным подчеркиванием обозначен сигнал полиаденилирования, а звездочка означает стоп-кодон.

Для выяснения полной аминокислотной последовательности пептида на основе частично известной первичной структуры были сконструированы вырожденные праймеры, которые использовались для амплификации 3'-конца (3'-RACE) кДНК, синтезированной на матрице тотальной РНК актинии *U. eques*. С помощью ПЦР с универсальным праймером T7Cap и вырожденными праймерами UE-d1 и UE-d2 был получен фрагмент размером ~400 п.о. ПЦР продукт клонировали в вектор pAL-TA и секвенировали. На основе полученной нуклеотидной последовательности были синтезированы обратные праймеры UE-r1 и UE-r2 для 5'-RACE. Фрагмент ДНК размером ~300 п.о., полученный с помощью ПЦР на матрице кДНК с универсальным праймером T7Cap и обратными праймерами UE-r1 и UE-r2, был клонирован в вектор

pAL-TA и секвенирован. ДНК, кодирующая предшественник пептида (ENA ID: LT600337) и соответствующая ей транслированная аминокислотная последовательность пептида, показаны на рисунке 24. Полная последовательность белка-предшественника содержит 74 аминокислотных остатка. При сравнении полученной секвенированием N-концевой аминокислотной последовательности и транслированной последовательности, соответствующей гену белка-предшественника, выяснили, что перед зрелым пептидом в предшественнике находится область из 29 аминокислотных остатков. Анализ с использованием SignalP 4.1 показал, что сайт сцепления сигнального пептида расположен между аминокислотными остатками Gly15 и Trp16. Таким образом, белок-предшественник содержит сигнальный пептид, состоящий из 15 а.о., пропептид, начинающийся с Trp16 и заканчивающийся Arg29 (14 а.о.), за которыми следует зрелый пептид, содержащий 45 а.о. Полная аминокислотная последовательность пептида включает 10 остатков цистеина. Предполагая наличие пяти дисульфидных связей, рассчитанная средняя молекулярная масса пептида составит 4792,13, моноизотопная - 4788,62 Да. Последняя практически идентична моноизотопной массе выделенного пептида, определенной с помощью HR-ESI масс-спектрометрии (4788,63 Да). Зрелый пептид является анионом с суммарным зарядом при нейтральных рН равном -3 и изоэлектрической точкой pI 5,28. В базах данных не обнаружено пептидов гомологичных выделенному.

Морских анемонов можно считать лидерами среди ядовитых животных с точки зрения структурного разнообразия продуцируемых ими полипептидов. Содержащиеся в ядах животных, полипептиды имеют четное количество цистеиновых остатков, которые образуют дисульфидные связи, обеспечивающие формирование жесткой структуры устойчивой к протеолизу [331,332].

Пептид из яда *U. eques* не имеет гомологов среди известных охарактеризованных нейротоксинов морских анемонов. Большинство Cys-богатых пептидов актиний состоят из 25-60 а.о., содержат 4-10 остатков цистеина и большое количество положительно заряженных аминокислот (Lys, Arg), образующих заряженные кластеры на поверхности молекул [321,333]. Около 50% известных пептидов морских анемонов являются лигандами натриевых или калиевых каналов, и их положительно заряженные и гидрофобные аминокислотные остатки играют важную роль во взаимодействии токсина с каналом.

Система классификации сортирует известные цистеин-богатые пептиды морских анемонов по расположению остатков Cys в аминокислотной последовательности [322]. Все молекулы подразделяются на 11 семейств по характерным позициям цистеиновых остатков в полипептидной цепи, и каждому семейству присущ определенный вариант фолдинга. Кроме того, в полипептидах морских анемонов было идентифицировано по меньшей мере 16 различных цистеиновых мотивов [322]. Пептид из яда *U. eques* имеет уникальное расположение цистеинов и не может быть отнесен ни к одному из 11 пептидных семейств актиний. Таким образом, пептид относится к новому семейству с Cys-мотивом C6C2C5C4C6C5C6CCC# (где # от 1 до 9 а.о.), и является первым представителем 12-й подгруппы цистеин-богатых полипептидов морских анемонов. В соответствии с классификацией [322], пептид был назван τ -AnmTx Ueq 12-1 (сокращенно Ueq 12-1).

В поисковой системе NCBI BLAST (non-redundant protein sequences, nr) и транскриптомов (Transcriptome shotgun assembly, Tsa_nr) или в доступных базах данных антимикробных пептидов не найдено гомологов Ueq 12-1. Также StellaBase (геномная база данных *Nematostella vectensis*), база данных Pocillopora Transcriptomics (транскриптом коралла *Pocillopora damicornis*) и EdwardsiellaBase (геномная база данных *Edwardsiella lineata*) не содержат последовательностей гомологичных пептиду Ueq 12-1. Кроме того, используя инструмента InterProScan, в пептиде не было обнаружено никаких известных консервативных белковых доменов.

Однако в базе данных EST были найдены некоторые малые цистеин-богатые пептиды (SCRiPs, Small Cysteine Rich Peptides) из кораллов и актиний со сходным расположением Cys в полипептидной цепи [334]. Кроме того, одна кДНК, кодирующая пептид SCRiP (TSA: *Anthopleura elegissima* comp63456_c0_seq1, транскрибированная последовательность РНК, GBYC01024820.1), была обнаружена в базе данных транскриптомов Transcriptome shotgun assembly (TSA) с помощью поиска TBLASTN. В базе данных TSA присутствует множество различных кДНК, кодирующих пептиды SCRiPs, которые можно идентифицировать с помощью известных SCRiPs и поиска TBLASTN в транскриптомах стрекающих, однако гомология SCRiPs, выделенных из разных биологических видов, очень низкая.

Характерной особенностью Ueq 12-1 и найденных SCRiPs является наличие последовательности из трех цистеинов, расположенных на С-конце (рис. 25). Поскольку

все последовательности SCRiPs получены из базы данных кДНК, то отсутствует информация об их функциях и пространственной структуре. Найденные SCRiP содержат только восемь остатков цистеина, и их распределение аналогично положению восьми С-концевых цистеинов Ueq 12-1 (рис. 25). Помимо Cys-мотивов между Ueq 12-1 и SCRiP нет существенной структурной гомологии. Вероятно, Ueq 12-1 и SCRiPs имеют общего эволюционного предка и демонстрируют эволюционное происхождение токсинов стрекующих кишечнополостных [334].

```

Ueq 12-1  CYPGQPGCGHCSRPN-YCEGAR--CESGFHD-CGSDHW-CDASGD-RCCCA
TSA: A.e1.      ADCHVGRGYCLYRTACRSGFHH-CEREFS-CHSSRD-RCCCAD
C0H690      FHPNLWRPPRCDWPHGVCSYIRDRCAPDTPFFCGPIFA-CPLPTN-KCCC
C0H691      GDCDWPTGVCFYIHDPCPPGLRR-CPQHDDGCYLPTN-HCCCYP
C0H692      GSPCSNYEGSCTPNHIPCPPGSHE-CRQLPG-CYPGVE-RCCCQY
C0H693      AFADQQFCDHPYGTCYYVEDECPEDMPVDCSENFY-CTEPTN-KCCCYE
FK725749    ASCSSRGGICRSTSIGCPRRYHS-CHLFHH-CRSHGDS-CCCPNYG
FC835414    ECNSYRGQCTYMGHPCPDHTFP-CETYFD-CPAGPHERCCCYKD

```

Рисунок 25. Выравнивание аминокислотной последовательности Ueq 12-1 (идентификатор базы данных UniProt Protein Database: C0HK26) и малых цистеин-богатых пептидов (SCRiPs). TSA: A. e1. - пептид, найденный в базе данных TSA: *Anthopleura elegantissima* comp63456_c0_seq1, транскрибированная последовательность РНК, GBYC01024820.1. C0H690 – пептид SCRiP1 из *Acropora millepora*; C0H691 – пептид SCRiP2 из *A. millepora*; C0H692 – пептид SCRiP3 из *A. millepora*; C0H693 – пептид SCRiP1a из *Montipora capitata*; FK725749 - пептид *Anemonia viridis*; и FC835414 - пептид *Metridium senile*. Жирным шрифтом выделены аминокислотные остатки, идентичные оным в Ueq 12-1.

Пространственная структура Ueq 12-1 была определена с помощью ЯМР-спектроскопии. Используя набор из 100 случайных стартовых точек для расчета структур с помощью программного обеспечения CYANA [305] и следующие экспериментальные данные: межпротонные расстояния, стереоспецифичность, ограничения на торсионных углах и водородных связях. Было получено 20 вариантов возможных укладок пептида (рис. 26).

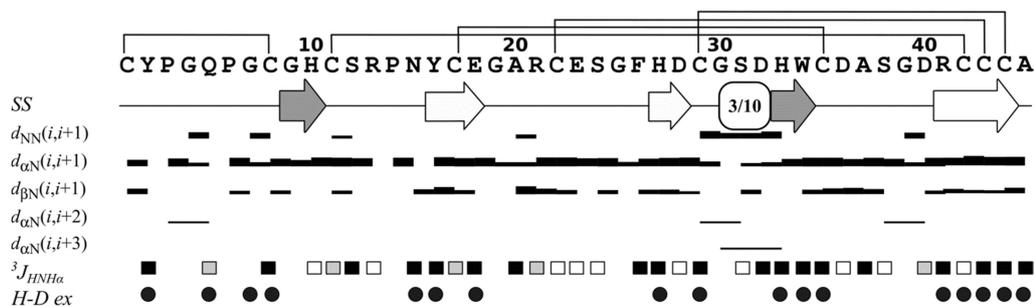


Рисунок 26. Данные ЯМР-спектроскопии, характеризующие вторичную структуру Ueq 12-1. Показаны скорость обмена амидных протонов на дейтерий растворителя (H-D ex), константы $^3J_{\text{HNH}\alpha}$, вторичная структура Ueq 12-1 (SS) и ядерный эффект Оверхаузера (ЯЭО, NOE) (d_{ij}) относительно аминокислотной последовательности пептида. Ширина полос соответствует относительной интенсивности кросс-пика в спектре NOESY (80 мс). Круги обозначают протоны HN, время обмена которых на дейтерий растворителя составляет более 15 мин. Черные, серые и белые прямоугольники обозначают остатки с большими (> 8 Гц), средними (6-8 Гц) или малыми (<6 Гц) величинами $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ соответственно. Элементы вторичной структуры (β -тяжи) обозначены стрелками, цвет стрелок указывает на участие тяжа в формировании параллельного (серый) или антипараллельного (белый) β -листа.

Согласно полученным данным, Ueq 12-1 имеет укладку похожую на формы буквы «W» (рис. 27 А, Б). Ядро структуры образовано тремя антипараллельными β -листами (тяжи Y16-E18, H27-D28 и R41-C44), небольшим параллельным β -листом из двух тяжей (G9-H10, H33-W34) и один поворотом спирали 3_{10} (G30-D32). Пространственная структура содержит также три большие петли, включая 8 β -поворотов различных типов (Y2-Q5, IV; Q5-C8, IV; S12-N15, VIa1; R13-Y16, IV; E18-R21, IV; E23-F26, IV; C35-S38, VIII; A37-D40, IV), и стабилизирована 5 дисульфидными мостиками (C1-C8, C11-C42, C17-C35, C22-C43 и C29-C44). Анализ скоростей обмена амидных протонов на дейтерий растворителя показал наличие в структуре 19 водородных связей. Кроме того, в одной из петель Ueq 12-1 присутствует ряд ароматических и отрицательно заряженных аминокислотных остатков, которые участвуют в укладке и π -анионных взаимодействиях (Y16, F26, E18, E23). Поверхность пептида является полярной без выраженных положительно или отрицательно заряженных кластеров (рис. 27 В, Г).

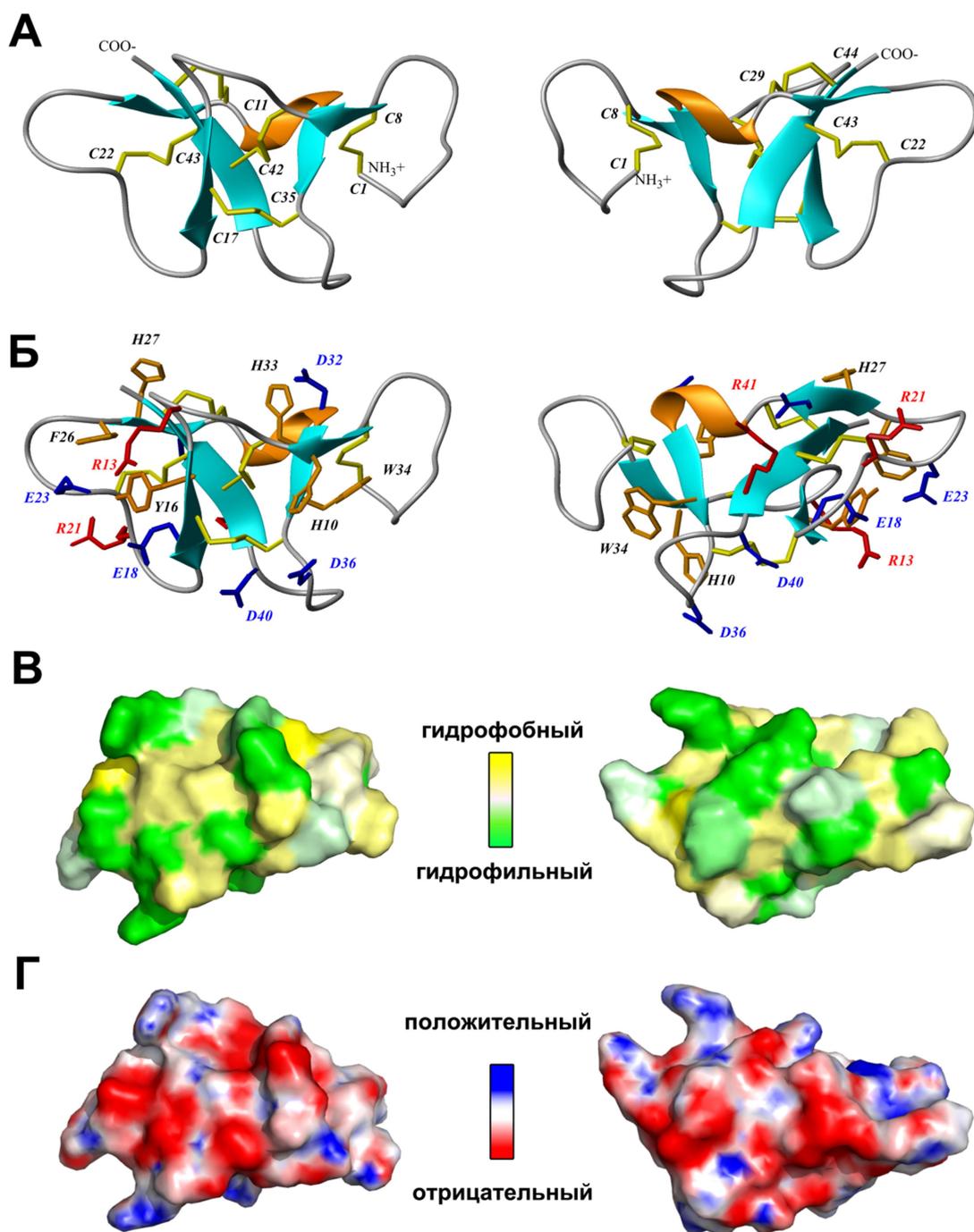


Рисунок 27. Пространственная структура Ueq 12-1 (PDB ID: 5LAN). **А, Б.** Ленточный вид. Дисульфидные мостики показаны желтым цветом, положительно заряженные а.о. – красные, отрицательно заряженные а.о. – синие, ароматические а.о. – оранжевые. **В.** Гидрофобные свойства поверхности Ueq 12-1. В соответствии с молекулярным гидрофобным потенциалом (МГП) поверхность пептида окрашена от желтого (гидрофобного) до зеленого (гидрофильного) оттенков [30]. **Г.** Молекулярная поверхность Ueq 12-1, окрашена в соответствии с электростатическим потенциалом.

Таблица 4. Результаты выравнивания пространственной структуры Ueq 12-1 с помощью PDBeFold (PDB ID: 5LAN). «Качество» Q рассчитывается как $Q = N_{\text{align}} \times N_{\text{align}} / ((1 + (\text{RMSD} / R_0)^2) \times N_{\text{res1}} \times N_{\text{res2}})$, где $R_0 = 3 \text{ \AA}$, Z - оценка статистической значимости. Чем выше Z, тем выше статистическая значимость.

<i>Пептиды</i>	<i>PDB код</i>	<i>N res</i>	<i>N align</i>	<i>% iden</i>	<i>Score Q</i>	<i>Score Z</i>	<i>RMSD</i>
Сcryptidin-4, мышинный альфа-дефензин Crp4	1tv0	32	29	21	0,46	4,2	1,54
Дефензин-подобный пептид из яда утконоса DLP-2	1zue	42	38	13	0,40	4,0	2,85
Бета-дефензин человека HBD-2	1e4q	37	34	18	0,39	3,7	2,67
Дефензин-подобный пептид из яда утконоса DLP-4	1zuf	42	38	13	0,38	3,1	3,00
Бета-дефензин человека HBD-1	1e4s	36	31	19	0,38	5,5	2,24
Циклотид Kalata B12 из <i>Oldenlandia affinis</i>	2kvx	28	22	14	0,31	2,8	1,42
Anthopleurin-A из яда актинии <i>Anthopleura xanthogrammica</i>	1ahl	49	30	23	0,26	5,3	2,27
CGNA из яда актинии <i>Condylactis gigantea</i>	2h9x	47	30	20	0,25	5,0	2,50

Пространственная укладка Ueq 12-1 сходна со структурой некоторых дефензин-подобных пептидов млекопитающих и Cys-богатых токсинов морских анемонов, имеющих β -структурную дефензин-подобную укладку (семейство SCOP g.9.1.1) [335]. В ходе анализа трехмерной конфигурации Ueq 12-1 с помощью инструмента PDBeFold [309] были найдены следующие структурные гомологи пептида (табл. 4 и рис. 28): мышинный альфа-дефензин Crp4 (Cryptidin-4, 1tv0), дефензин-подобный пептид из яда утконоса DLP-2(4) (1zue, 1zuf), бета-дефензины человека HBD-2 и HBD-1 (1e4q, 1e4s), растительный циклотид Kalata-B12 (2kvx) и два пептидных токсина, Anthopleurin-A (1ahl) и CGNA (2h9x), из ядов актиний. Таким образом, несмотря на отсутствие гомологии первичной структуры, пространственная конфигурация Ueq 12-1 сходна с

укладкой дефензин-подобных пептидов (рис. 28, таблица 4), причем структура более похожа на дефензины млекопитающих, чем токсины морских анемонов. Качество структурного выравнивания оценивали по величине «качества» Q, которое является функцией выравнивания C α атомов, максимизированной алгоритмом выравнивания вторичных структур (SSM). «Качество» Q - это сложная характеристика, которая учитывает как длину выравнивания, так и RMSD (среднее квадратичное расстояние между C α -атомами совпадающих а.о. гомологичной трехмерной структуры и целевого пептида). Чем выше величина Q, тем лучше в пространстве сходятся укладки.

Для всех выравниваний «качество» Q было не очень высоким, 0,46-0,38, в структурном выравнивании Ueq 12-1 и альфа-дефензина мыши Crp4 (1tv0), дефензин-подобного пептида из яда утконоса DLP-2(4) (1zue, 1zuf) или бета-дефензина человека HBD-2 (1e4q); а для Ueq 12-1 и пептидов морских анемонов, Anthopleurin-A (1ahl) и CGNA (2h9x), величина Q составила ~0,25. Для сравнения, «качество» Q при структурном выравнивании Anthopleurin-A (1ahl) и CGNA токсина (2h9x) равняется 0,7; для дефензин-подобного пептида из яда утконоса DLP-4 (1zuf) и бета-дефензина человека HBD-2 (1e4q) - 0,52; а для альфа-дефензина мыши Crp4 (1tv0) и бета-дефензина человека HBD-2 (1e4q) - 0,47.

Все описанные выше дефензины и дефензин-подобные пептиды содержат по 6 цистеинов, которые образуют 3 дисульфидные связи, тогда как у Ueq 12-1 десять цистеинов формируют пять S-S мостиков. Кроме того, ни один из этих пептидов не содержит мотив CCC на С-конце полипептидной цепи, присутствующий в аминокислотной последовательности Ueq 12-1. Дефензины делятся на два типа и отличаются конфигурацией дисульфидных связей. В альфа-дефензинах (1tv0) три S-S мостика имеют топологию C1-C6, C2-C4, C3-C5, тогда как у бета-дефензинов (1e4q, 1zue, 1e4s, 1ahl и т.д.) дисульфидные связи образованы между а.о. C1-C5, C2-C4, C3-C6 [336] (рис. 28). В пептиде Ueq 12-1 цистеины замыкаются в конфигурации C1-C2, C3-C8, C4-C7, C5-C9, C6-C10. Дисульфидные мостики C3-C8, C4-C7, C5-C9 Ueq 12-1 соответствуют расположению S-S связей в бета-дефензинах, тогда как пары C1-C2 и C6-C10 являются дополнительными, характерными только для данного пептида (рис. 28 Б). Дисульфидная связь C1-C2 стабилизирует уникальную N-концевую петлю Ueq 12-1.

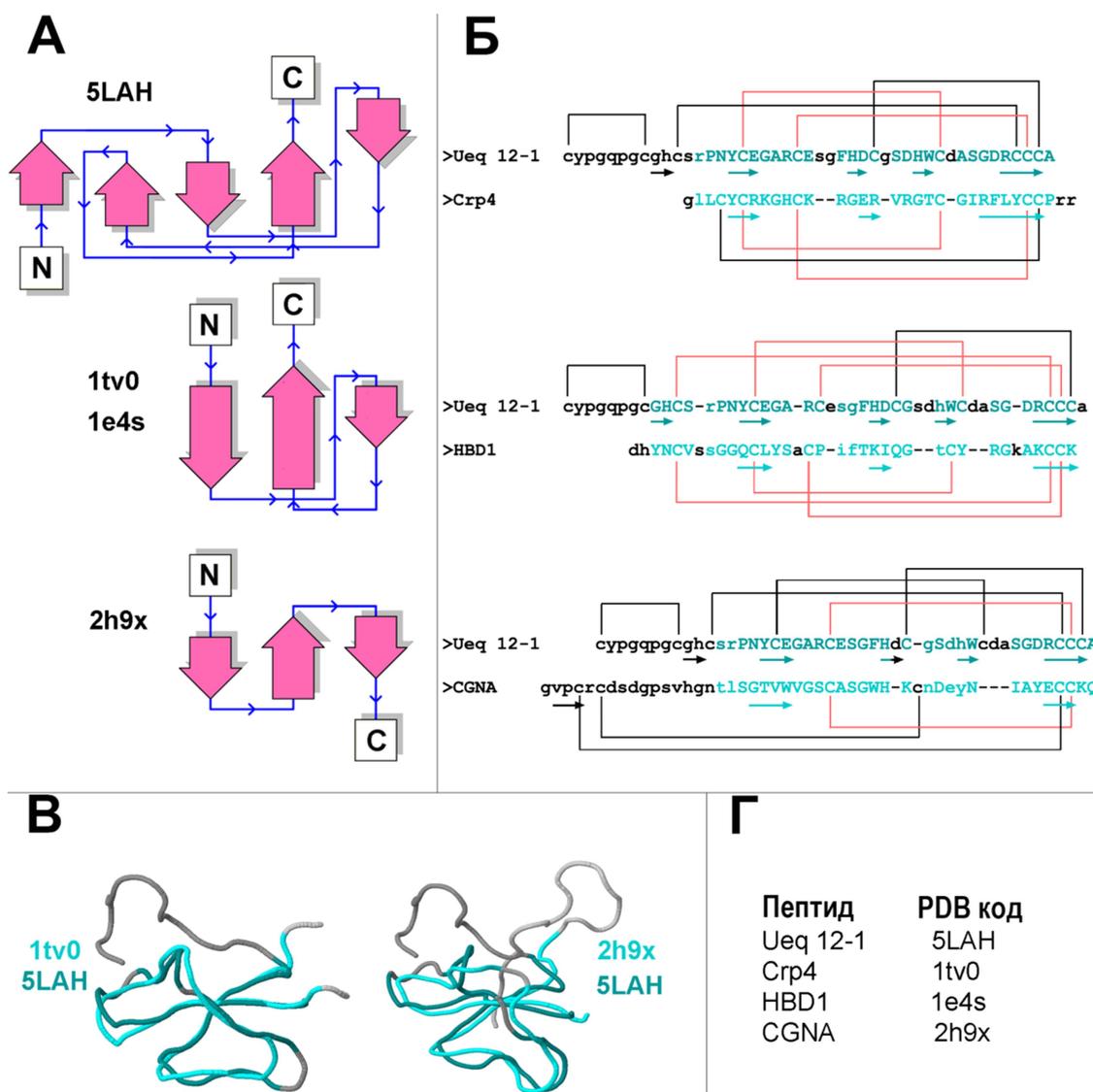


Рисунок 28. Сравнение пространственной структуры Ueq 12-1 с трехмерной структурой дефензин-подобных пептидов. **А.** Схематическое изображение пространственного расположения вторичных структур Ueq 12-1, дефензинов и дефензин-подобных пептидов. **Б.** Выравнивание аминокислотных последовательностей, основанное на гомологии пространственной структуры Ueq 12-1 с альфа-дефензином мыши Crp4 (1tv0), бета-дефензином человека HBD-1 (1e4s) и CGNA токсином (2h9x) из яда актинии *Condylactis gigantea*. Аминокислотные последовательности выровнены в соответствии с эквивалентной топологической структурой, определенной алгоритмом PDBeFold. Бета-тяги показаны стрелками. Аминокислотные остатки, которые сошлись в пространственном выравнивании, выделены голубым разных оттенков, а остатки с расстоянием между атомами Ca более 3 Å показаны прописными буквами. Одинаковые дисульфидные связи выделены красным. **В.** Пространственные выравнивания остова молекул Ueq 12-1 и дефензин-подобных пептидов - мышинового альфа-дефензина Crp4 (1tv0) и CGNA токсин (2h9x). **Г.** Короткие названия пептидов и соответствующие им коды в базе данных PDB.

Пептиды с дефензин-подобной укладкой относятся к 1 структурной группе нейротоксинов морских анемонов. Мишенями этих пептидов являются различные ионные каналы, такие как натриевые, калиевые и кислото-чувствительные. Наиболее близкие структурные гомологи Ueq 12-1, выделенные из ядов актиний *Anthopleura xanthogrammica* (Anthopleurin-A (1ahl) [337]) и *Condylactis gigantea* (CGNA (2h9x) [338]), действуют на натриевые каналы и имеют сходные первичные структуры (~50% идентичности). Оба пептида относятся к токсинам группы 1a [322]. Anthopleurin-A состоит из 49 а.о. и вызывает задержку инактивации потенциал-чувствительных Na⁺-каналов в сердце [339]. Токсин CGNA содержит 47 а. о. и действует на тетродотоксин- и потенциал-чувствительные Na⁺-каналы, увеличивая константу времени инактивации и скорость восстановления после инактивированного состояния [338]. Оба токсина содержат 6 цистеинов, но только одна их дисульфидная связь (C3-C6) из трех соответствует в структурном выравнивании S-S мостику пептида Ueq 12-1 (рис. 28 Б).

На рисунке 28 А показано схематическое пространственное расположение β -тяжей Ueq 12-1 и дефензин-подобных пептидов. Значительная часть вторичных структур Ueq 12-1 имеет дефензин-подобную укладку, которая встречается у биологически активных пептидов, продуцируемых морскими анемонами и утконосами. Все известные дефензины млекопитающих обладают аналогичной пространственной структурой – тройной антипараллельный β -лист [336]. Ядро молекулы Ueq 12-1 образовано тремя антипараллельными β -тяжами: Y16-E18, H27-D28 и R41-C44. Отличительной особенностью структуры Ueq 12-1 от дефензин-подобных пептидов является дополнительный параллельный β -лист, содержащий два тяжа (G9-H10 и H33-W34) и один поворот спирали 3_{10} (G30-D32) (рис. 25 и 26). Также в полипептидной цепи Ueq 12-1 цистеины распределены иначе, и их положение аналогично описанному ранее Cys-мотиву SCRiPs. Данных о пространственной структуре SCRiPs отсутствуют, однако, известно, что некоторые из них могут проявлять токсичность по отношению к *Danio rerio* в довольно высоких концентрациях (230 мкг/мл) [334]. Основываясь на данных о пространственной структуре Ueq 12-1, можно предположить, что SCRiPs также имеют дефензин-подобную укладку, так как их цистеины расположены аналогично цистеинам дефензин-подобного домена Ueq 12-1. Таким образом, возможно некоторые SCRiP могут также проявлять антимикробные свойства и действовать на ионные каналы.

4.2. Получение рекомбинантных аналогов пептидов

Для получения пептидов в количестве достаточном для проведения функциональных исследований были синтезированы рекомбинантные формы Ms 9a-1 и Ueq 12-1 в виде слитных белков с тиоредоксином в бактериальной системе экспрессии. Тиоредоксин (Trx) обеспечивает высокий выход цистеин-богатых полипептидов с нативной конформацией [340]. Слитый белок (Trx-пептид) выделяли с помощью металл-аффинной хроматографии, а затем подвергали расщеплению BrCN и очищали рекомбинантный пептид, используя ОФ-ВЭЖХ.

4.2.1. Получение рекомбинантного аналога Ms 9a-1

Ген, кодирующий зрелый пептид Ms 9a-1, был сконструирован из синтетических олигонуклеотидных праймеров, а затем клонирован в экспрессионный вектор pET32b (+). Полученной конструкцией pET32b/Ms 9a-1 трансформировали клетки *Escherichia coli* BL21 (DE3). Слитый белок выделяли с помощью металл-аффинной хроматографии и расщепляли BrCN для выделения рекомбинантного пептида. Конечный выход, очищенного с помощью ОФ-ВЭЖХ, пептида составил 2,4 мг/л клеточной культуры. Рекомбинантный и нативный пептиды имели одинаковую молекулярную массу, N-концевую аминокислотную последовательность и идентичное время удерживания при совместном нанесении пептидов на колонку с обращенной фазой для проверки правильной укладки рекомбинантного Ms 9a-1.

4.2.2. Получение рекомбинантного аналога Ueq 12-1

Синтетический ген, кодирующий Ueq 12-1, был получен с помощью ПЦР из синтетических олигонуклеотидных праймеров и клонирован в экспрессионный вектор pET32b (+). Клетки *Escherichia coli* SHuffle™ трансформировали полученной конструкцией pET32b/Ueq 12-1. Слитый белок (Trx-Ueq 12-1) выделяли с использованием металл-аффинной хроматографии, подвергали расщеплению BrCN и очистке с помощью ОФ-ВЭЖХ для получения чистого рекомбинантного пептида. Рекомбинантный Ueq 12-1 и нативный пептид имели одинаковое время удерживания

при фракционировании на хроматографической колонке с помощью ОФ-ВЭЖХ и аналогичный эффект в *in vitro* тестах на активность по отношению к TRPA1. Кроме того, анализ спектров ЯМР показал полную идентичность природного и рекомбинантного пептидов при pH 3,0. Это означает, что пептиды были идентичны. Выход Ueq 12-1 составил приблизительно 0,7 мг с литра бактериальной культуры. Средняя молекулярная масса рекомбинантного продукта, определенная с помощью МАЛДИ масс-спектрометрии (4792.60 Да), соответствовала теоретической массе, вычисленной по данным аминокислотной последовательности (4792,13 Да), и массе нативного пептида, измеренной с использованием метода HR-ESI масс-спектрометрии (4792,45 Да).

4.3. Исследование биологической активности пептидов *in vitro*

Пептиды тестировали на активности в отношении нескольких ионных каналов: rTRPA1, rTRPV1, hTRPV3, rASIC1a, hASIC3. Ни Ms 9a-1, ни Ueq 12-1 не действовали на rTRPV1, hTRPV3, rASIC1a и hASIC3 в концентрациях 3 мкМ и 20 мкМ соответственно. Также не наблюдалось прямой активации TRPA1 ни в кальциевом имиджинге, ни в электрофизиологических экспериментах. Однако при применении Ms 9a-1 или Ueq 12-1 совместно с агонистом TRPA1 (АИТС или диклофенак) происходило увеличение ответа рецептора на активирующий стимул.

Было обнаружено, что Ueq 12-1 является бифункциональной молекулой, которая обладает антибактериальным действием и потенцирует рецептор TRPA1 (рис. 32 и 33). Многофункциональность, по-видимому, является общей чертой пептидов морских анемонов. Например, они могут сочетать свойства ингибитора сериновых протеаз с ингибированием потенциал-чувствительных калиевых каналов [341,342] или TRPV1 рецептора [331,343]. Известно, что дефензин-подобный пептидный нейротоксин 2 (АТХ-II), выделенный из яда актинии *Anemonia sulcata*, изменяет воротный механизм натриевых каналов и обладает антимикробными свойствами [344]. Подобная многофункциональность биологически активных пептидов может быть результатом оптимальной стратегии создания защитных молекул, позволяющих морским анемонам

одновременно охотиться, и использовать их как антибактериальные агенты для борьбы с инфекциями при травме щупалец. Следует отметить, что человеческий бета-дефензин 2 (HBD-2), структурный гомолог Ueq 12-1, обладает антимикробными свойствами, является активатором кальций-зависимых калиевых каналов высокой проводимости (BKCa)-mSlo+hβ1 и ингибирует K_v1.3-каналы [336,345,346]. Таким образом многофункциональность является характерной чертой пептидов с дефензин-подобной пространственной укладкой.

4.3.1. Исследование активности пептида Ms 9a-1

4.3.1.1. Потенцирование АИТС-индуцированного ответа клеток CHO-rTRPA1

Активность Ms 9a-1 измеряли с помощью метода кальциевого имиджинга на клетках CHO-rTRPA1. Вход Ca²⁺ в клетки через TRPA1 был вызван селективным агонистом рецептора АИТС. Фракция яда актинии *M. senile* после SPE увеличивала на 30% агонист-индуцируемый ответ рецептора (100 мкМ АИТС). Нативный Ms 9a-1 обладал аналогичной потенцирующей активностью (рис. 29 А). Кроме того, рекомбинантный и природный пептиды демонстрировали одинаковые эффекты на TRPA1 в равных концентрациях, и ни один из них не вызывал увеличение концентрации кальция в клетках CHO-rTRPA1 в отсутствие агониста рецептора.

Эксперименты показали, что действие пептида зависит от уровня активации TRPA1. Анализ величины потенцирующего эффекта Ms 9a-1 от концентрации агониста показал дозозависимое увеличение внутриклеточного [Ca²⁺]_i в диапазоне концентраций АИТС от 15 мкМ до 500 мкМ. Однако действие пептида в присутствии 1000 мкМ АИТС вызывало меньшее увеличение ответа, чем при 500 мкМ АИТС, что, скорее всего, вызвано десенситизацией TRPA1 агонистом. Прединкубация клеток CHO-rTRPA1 с Ms9a-1 (1 мкМ) не изменяла эффективность потенцирования ни при низких (15-50 мкМ), ни при высоких (500-1000 мкМ) концентрациях АИТС. Максимальное потенцирующее действие Ms 9a-1 (35-55%) наблюдалось при средних значениях концентраций агониста (100-300 мкМ) (рис. 29 Б).

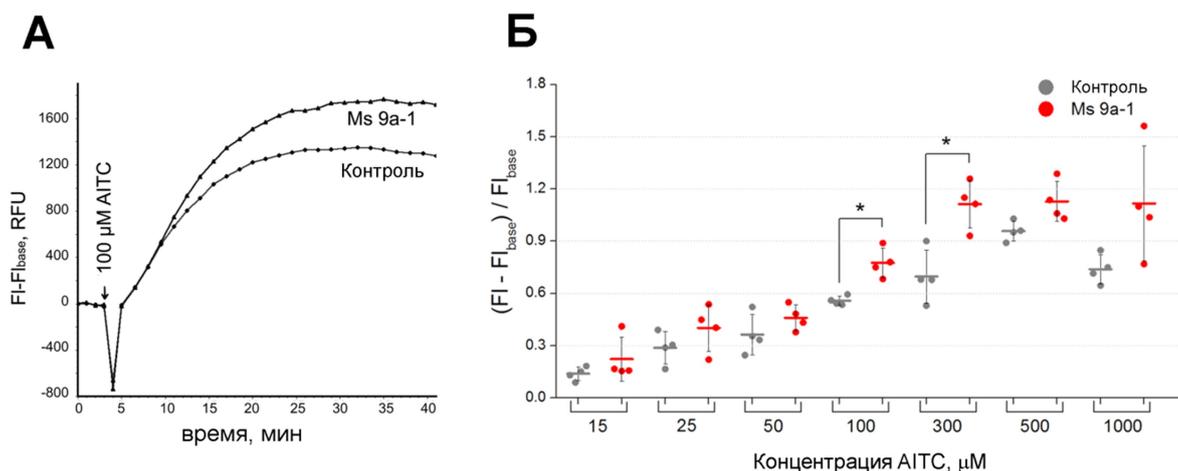


Рисунок 29. Ms 9a-1 потенцирует агонист-индуцируемый ответ rTRPA1. **А.** Увеличение концентрации кальция $[Ca^{2+}]_i$ в клетках CHO-rTRPA1 в ответ на действие 100 мкМ АИТС в отсутствии (контроль) и в присутствии нативного Ms 9a-1 (500 нМ). Представлены графики средних репрезентативных значений ($n = 4$) флуоресцентных сигналов кальциевого имиджинга. $[Ca^{2+}]_i$ ответы вычисляли как разность интенсивности флуоресценции до (FI_{base}) и после добавления агониста (FI). **Б.** Потенцирующий эффект рекомбинантного Ms 9a-1 (1 мкМ) при различных концентрациях АИТС (15-1000 мкМ). Данные представлены в виде средних величин \pm S.D. ($n = 4$); *, $p < 0,05$ (двусторонний t-тест). RFU, относительные флуоресцентные единицы.

4.3.1.2. Электрофизиологическое тестирование на ооцитах *Xenopus laevis*, экспрессирующих rTRPA1

Пептид Ms 9a-1 обладал дозозависимым потенцирующим эффектом, он увеличивал индуцированные диклофенаком ионные токи через TRPA1 в электрофизиологических экспериментах на ооцитах *Xenopus laevis*, экспрессирующих рецептор (рис. 30, 31). Запись ионных токов проводили при повторяющихся импульсах напряжения с линейным изменением потенциала от -80 мВ до +80 мВ. Ms 9a-1 значительно увеличивал величину входящего тока, индуцированного агонистом TRPA1, но действие пептида на исходящий ток было нестабильным (рис. 30 А). Максимальный эффект потенцирования диклофенак-индуцированных входящих токов достигал ~90% при концентрации пептида 1 мкМ (рис. 30 Б). Полумаксимальная эффективная концентрация (EC_{50}) Ms 9a-1 при -80 мВ составила 122 ± 41 нМ ($n_H 0,79 \pm 0,19$).

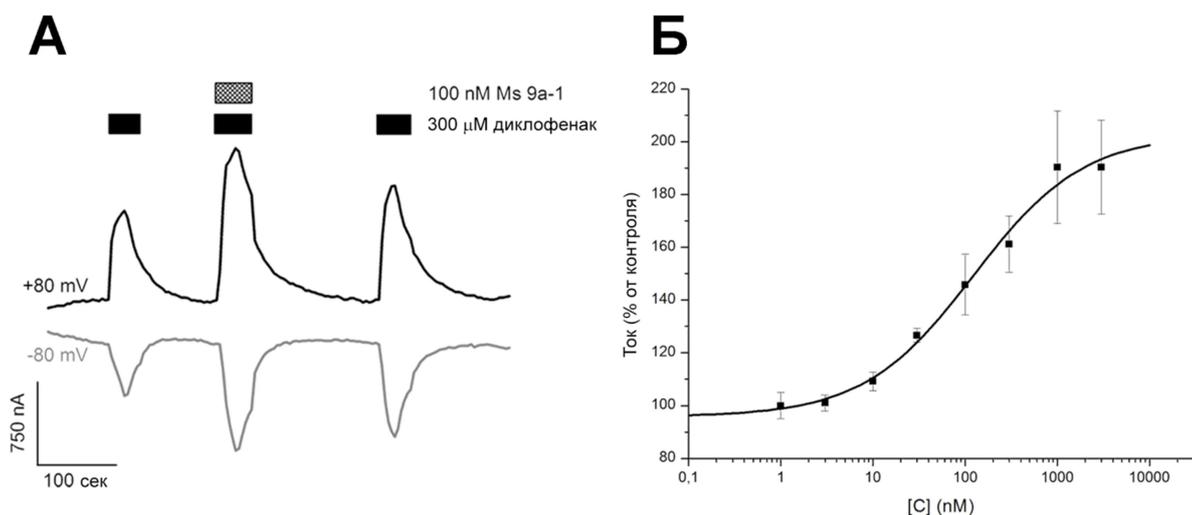


Рисунок 30. Влияние Ms 9a-1 на диклофенак-индуцированные токи, опосредованные γ TRPA1. **А.** Запись диклофенак-индуцированных ионных токов на ооцитах *X. laevis*, экспрессирующих γ TRPA1, в отсутствии и в присутствии 300 мкМ Ms 9a-1 при ступенчатом изменении потенциала от -20 мВ до +80 мВ (черная линия) и -80 мВ (серая линия). **Б.** Кривая дозозависимости потенцирующего эффекта Ms 9a-1 на диклофенак-индуцированный входящий ток, опосредованный TRPA1. Каждая точка представляет среднее ($n = 4-7$) значение \pm S.E. Экспериментальные точки в пределах погрешности ложатся на логистическую кривую.

Устойчивое потенцирующее действие пептида на исходящий ток наблюдалось при использовании протокола записи с повторяющимся ступенчатым изменением потенциала от -20 мВ до +80 мВ (рис. 31). Причём максимальный эффект потенцирования исходящего тока при концентрации пептида 1 мкМ и в присутствии диклофенака или АИТС в качестве активатора достигал ~80% (рис. 31 А и Г), а рассчитанная EC_{50} Ms 9a-1 при активации рецептора диклофенаком составила $30 \pm 8,6$ нМ с коэффициентом n_H $0,62 \pm 0,15$ (рис. 31 Б). Таким образом, действие пептида на агонист-индуцируемые входящие и исходящие токи было различно. В низких концентрациях (до 100 нМ) Ms9a-1 более эффективно потенцировал исходящие токи, а в концентрации 300 нМ пептид оказывал одинаковое влияние на оба ионных тока. Ms 9a-1 не десенситизировал рецептор TRPA1 при повторном применении диклофенака в присутствии Ms 9a-1, при этом наблюдался только сильный потенцирующий эффект (рис. 31 В).

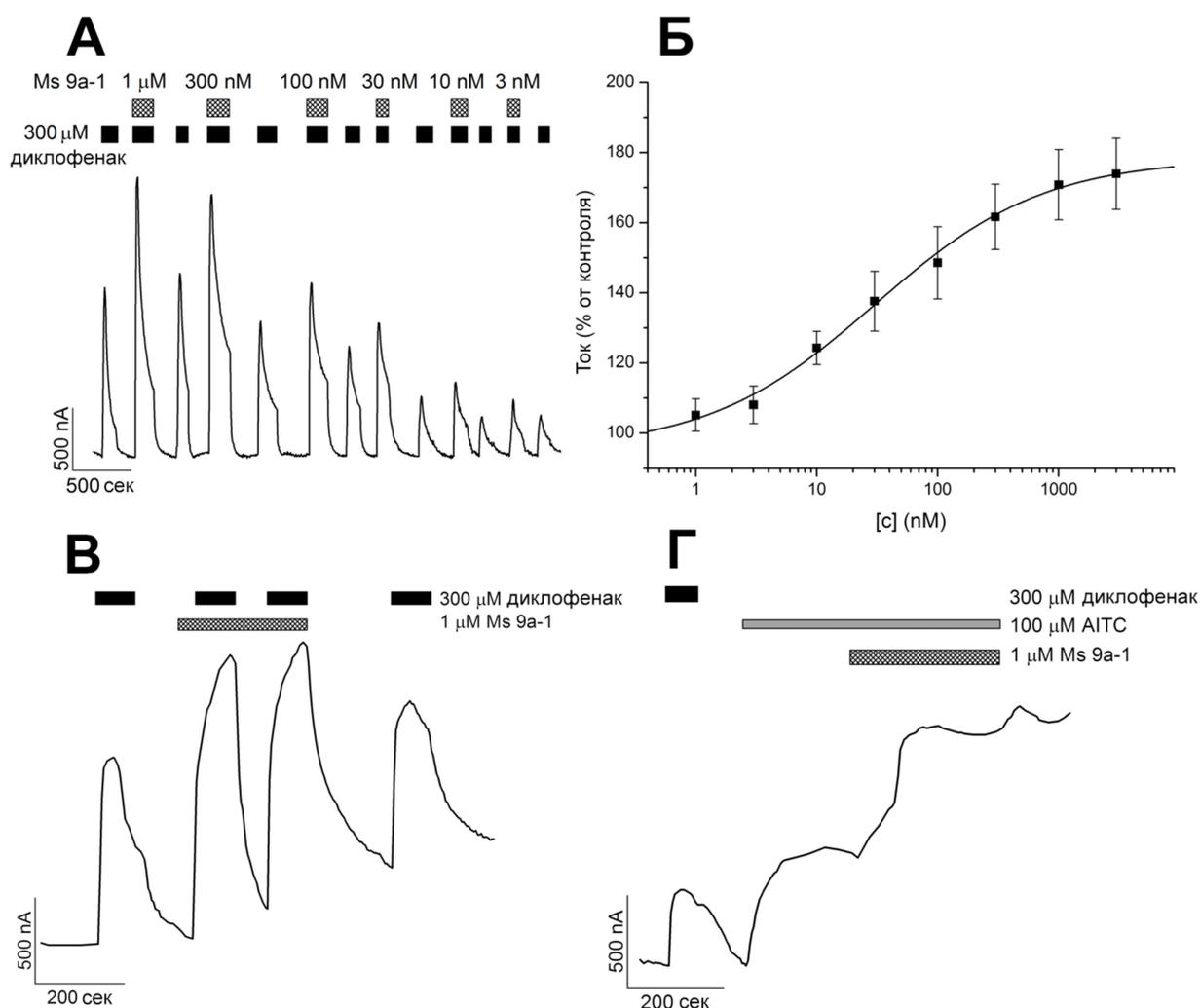


Рисунок 31. Влияние Ms 9a-1 на исходящий ток, опосредованный гTRPA1. **А.** Запись диклофенак-индуцированных ионных токов на ооцитах *X. laevis*, экспрессирующих гTRPA1, в отсутствии и в присутствии Ms 9a-1 при ступенчатом изменении потенциала от -20 мВ до +80 мВ. **Б.** Кривая дозозависимости потенцирующего эффекта Ms 9a-1 на диклофенак-индуцированный исходящий ток, опосредованный TRPA1. Каждая точка представляет среднее ($n = 3-7$) значение \pm С.Е. Экспериментальные точки в пределах погрешности ложатся на логистическую кривую. **В.** Ни прединкубация, ни постинкубация с Ms 9a-1 не вызывали десенситилизации диклофенак-индуцированного ответа TRPA1. **Г.** Запись потенцирующего эффекта Ms 9a-1 на AITC-индуцированные токи, опосредованные TRPA1.

4.3.1.3. Исследование на DRG нейронах, экспрессирующих TRPA1

Культированные нейроны спинальных нервных узлов (DRG) использовались для изучения потенцирующего действия Ms 9a-1 на изменение концентрации $[Ca^{2+}]_i$,

опосредуемое активацией TRPA1 в чувствительных нейронах, с помощью метода кальциевого имиджинга.

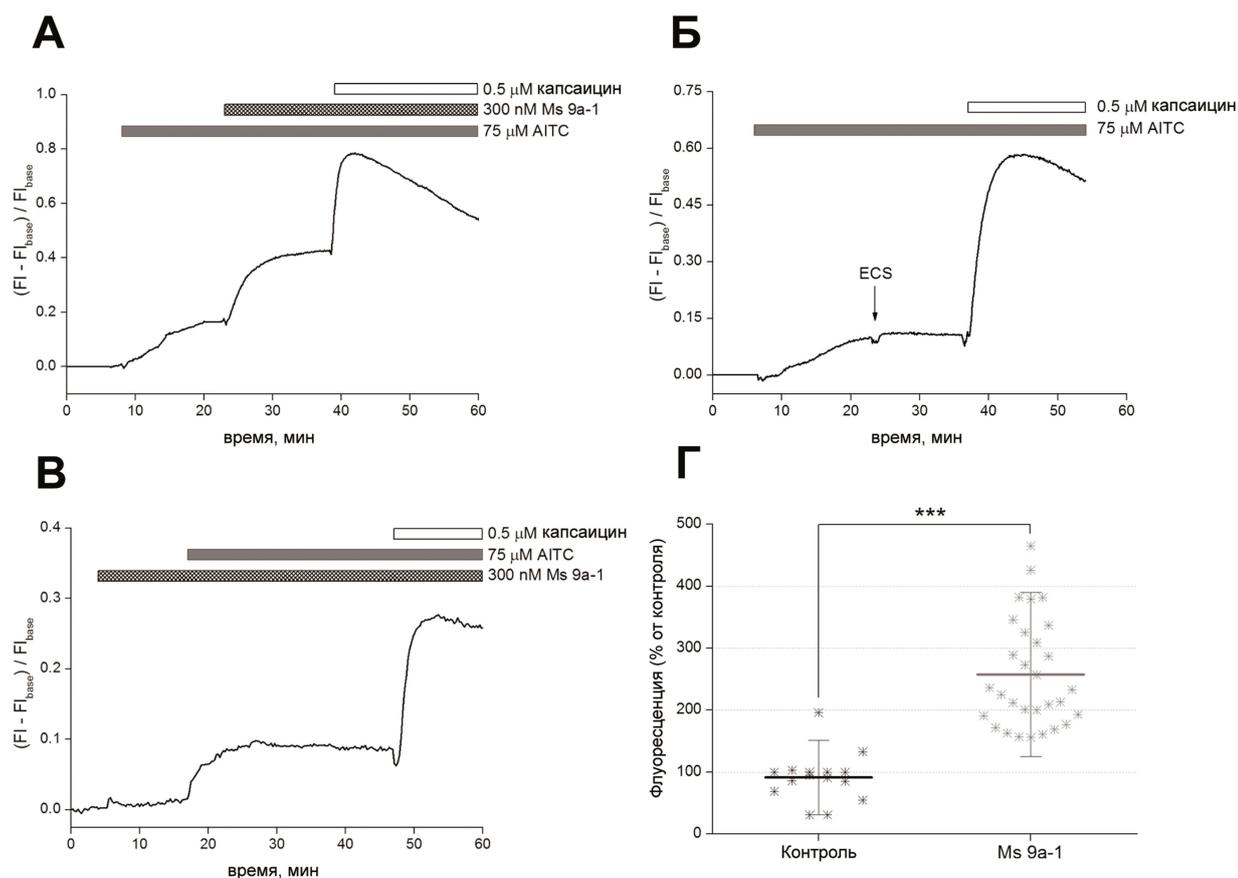


Рисунок 32. Потенцирующий эффект Ms9a-1 на АИТС-индуцированное увеличение $[Ca^{2+}]_i$, опосредованное TRPA1, в культивированных крысиных DRG нейронах. Представлены репрезентативные результаты. **А.** В присутствии Ms 9a-1 (300 нМ) увеличивалась интенсивность флуоресценции клеток в ответ на применение АИТС. **Б.** Добавление буферного раствора (ECS) после применения АИТС не изменяло уровень флуоресценции нейронов. **В.** Применение Ms 9a-1 (300 нМ) до агониста TRPA1 не вызывало увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в DRG нейронах. Изменения $[Ca^{2+}]_i$ рассчитывали как отношение разности интенсивности флуоресценции до (FI_{base}) и после добавления образцов (FI) к базовому уровню сигнала (FI_{base}). **Г.** Обобщенные данные: флуоресценция (% от контроля) = (максимум флуоресценции после применения пептида или буфера – флуоресценция до применения пептида или буфера) / базовый флуоресцентный сигнал $\times 100\%$. Результаты представлены в виде средних значений \pm S.D.; n = 15 (буфер), n = 30 (Ms 9a-1); ***, p < 0,001. Статистическую значимость оценивали с помощью двустороннего t-теста.

Пептид (300 нМ) вызывал значительное увеличение $157\pm 88\%$ ($n = 30$) интенсивности флуоресценции в DRG нейронах в присутствии агониста АІТС (рис. 32 А и Г), тогда как применение буфера (ESC) не вызывало клеточного ответа (рис. 32 Б и Г). Применение Ms 9a-1 до агониста TRPA1 также не изменяло интенсивность флуоресцентного сигнала в культивируемых чувствительных нейронах (рис. 32 В).

4.3.2. Исследование активности пептида Ueq 12-1

4.3.2.1. Антибактериальная активность

Очищенный нативный Ueq 12-1 тестировали на наличие антимикробной активности в отношении выбранных бактериальных штаммов. Исследование проводили на двух грамотрицательных штаммах (*E. coli* и *P. aeruginosa*) и двух грамположительных штаммах (*S. aureus* и *C. glutamicum*). *E. coli*, *P. aeruginosa* и *S. aureus* являются лабораторными штаммами соответствующих болезнетворных бактерий, представляющих опасность для здоровья человека. Штамм *C. glutamicum* не является патогенным и был выбран, поскольку обладает высокой чувствительности к антибактериальным соединениям, что увеличивает вероятность обнаружения минимальных количеств антимикробных пептидов [347]. Насколько известно, ни один из четырех бактериальных штаммов не является патогенным для актиний. Ueq 12-1 обладал умеренным антимикробным эффектом в отношении *C. glutamicum* (MIC = 50 мкМ), проявлял незначительную активность против *S. aureus* и не влиял на рост *P. aeruginosa* и *E. coli* (MIC > 200 мкМ) (рис. 33).

Антибактериальная активность Ueq 12-1 против грамположительного штамма *C. glutamicum* может быть связана с дефензин-подобной структурой пептида, поскольку, как известно, дефензины обладают антимикробным действием [336]. Способность дефензинов взаимодействовать с бактериальными мембранами обусловлена пространственной укладкой молекул, отношением полярных и гидрофобных остатков на поверхности и общим положительным зарядом пептида (присутствие большого числа основных аминокислотных остатков в последовательности), а не индивидуальными особенностями первичных структур [348]. Как правило возрастание общего положительного заряда молекулы увеличивает антимикробную активность пептидов AMP (antimicrobial peptides) в результате селективного воздействия AMP на

отрицательно заряженные мембраны бактерий. Например, антимикробный пептид Csp4 (сyrptidin-4, заряд +8) более эффективно связывается с отрицательно заряженными, чем нейтральными биологическими мембранами [349]. Однако антимикробная активность Ueq 12-1, скорее всего, обусловлена другими структурными элементами, поскольку пептид имеет отрицательный заряд при нейтральном рН ($pI = 5,28$) и сохраняет антибактериальное действие. Фактически, тройной β -лист с характерным расположением дисульфидных мостиков обеспечивает стабильность структуры дефензинов, но не является обязательной детерминантой антимикробной активности [348].

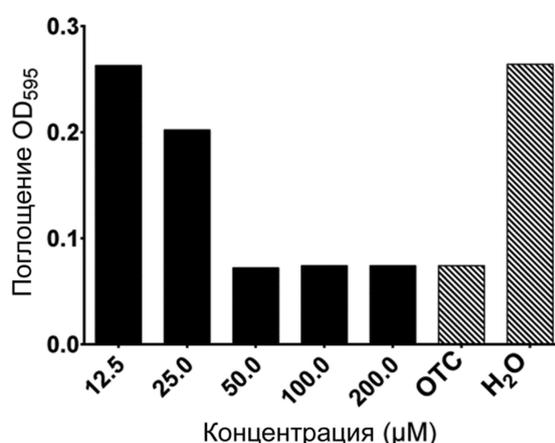


Рисунок 33. Антибактериальная активность Ueq 12-1 против *S. glutamicum* в диапазоне концентраций от 12,5 мкМ до 200 мкМ. Пептид обладает антибактериальным эффектом в концентрациях ≥ 50 мкМ. ОТС (тетрациклин, 40 мкМ) и H₂O служили положительным и отрицательным контролем.

4.3.2.2. Потенцирующий эффект пептида на активность рецептора TRPA1

Было установлено, что Ueq 12-1 в концентрации 1 мкМ увеличивает на $35 \pm 10\%$ аллилизотиоцианат (АИТС)-индуцированный кальциевый ток, опосредованный TRPA1, в стабильной клеточной линии СНО, экспрессирующей рецептор. Электрофизиологические эксперименты на ооцитах *Xenopus laevis*, экспрессирующих TRPA1, показали, что Ueq 12-1 в концентрации 240 мкМ значительно усиливает активацию TRPA1, индуцированную АИТС или диклофенаком, и не действует в отсутствие агонистов рецептора. Анализ дозозависимости потенцирующего эффекта проводили с использованием диклофенака (300 мкМ) в качестве активатора на ооцитах, экспрессирующих TRPA1 (рис. 34).

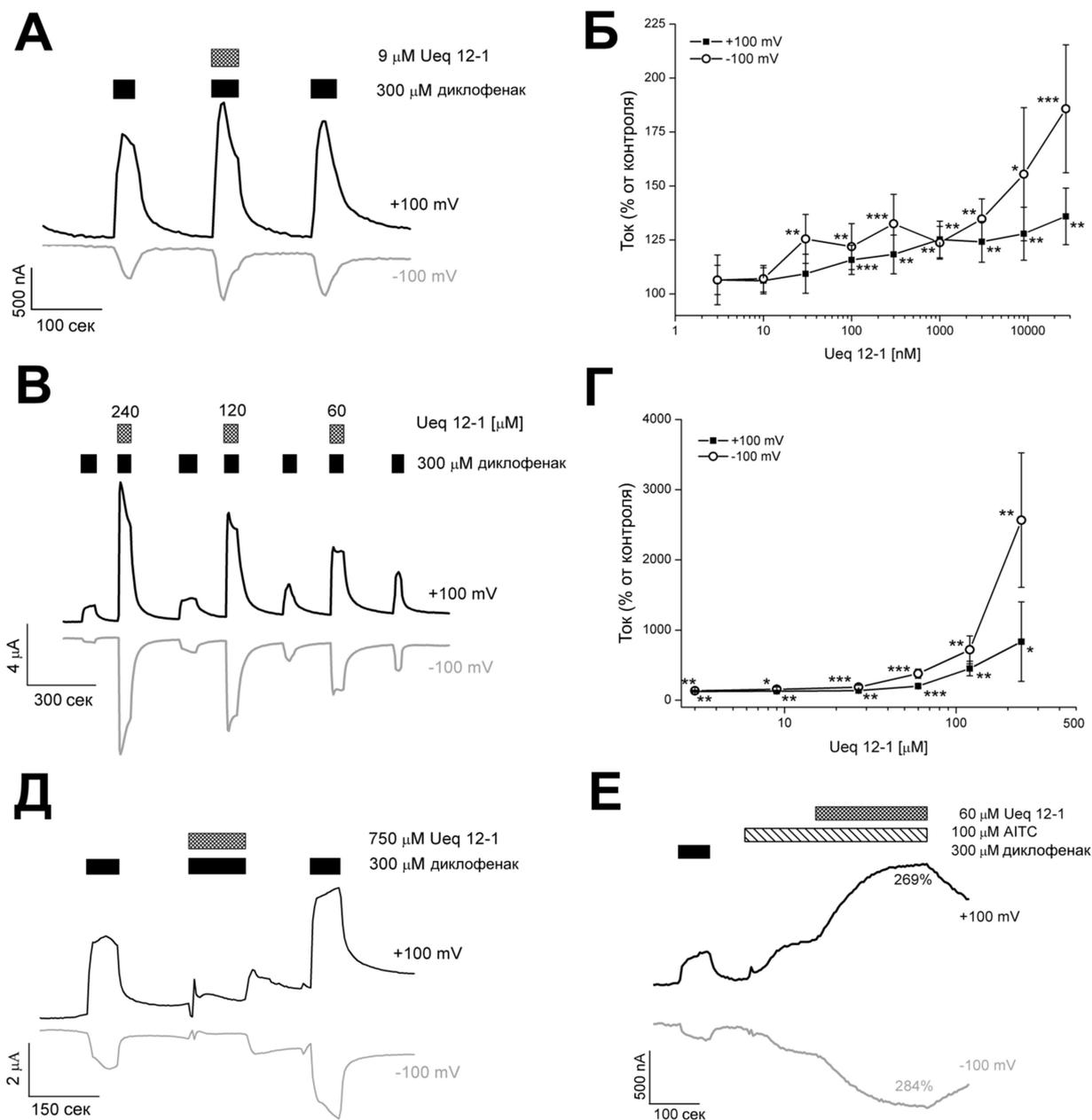


Рисунок 34. Влияние Ueq 12-1 на величину ионных токов, опосредованных TRPA1, в присутствии агонистов, диклофенака (300 мкМ) или АИТС (100 мкМ). **А.** Потенцирующий эффект низкой концентрации Ueq 12-1 (9 мкМ) на диклофенак-индуцированные токи. **Б.** Потенцирующая активность пептида в концентрациях 3-30 мкМ на диклофенак-индуцированные токи (приведены средние значения \pm SD, $n = 5-7$). **В.** Потенцирующий эффект высоких концентраций Ueq 12-1 (60-240 мкМ) на диклофенак-индуцированные токи. **Г.** Потенцирующая активность пептида в концентрациях 60-240 мкМ на диклофенак-индуцированные токи (приведены средние значения \pm SD, $n = 5-7$). **Д.** Утрата функциональности TRPA1 после применения 750 мкМ Ueq 12-1 в присутствии агониста. **Е.** Потенцирующий эффект Ueq 12-1 в концентрации 60 мкМ на АИТС- индуцированный ток.

В диапазоне концентраций от 0,3 мкМ до 27 мкМ Ueq 12-1 умеренно потенцировал исходящие токи, опосредованные TRPA1, до 120-135%, а входящие токи до 132-186% (рис. 34 А, Б). Более высокие концентрации пептида вызывали еще большее увеличение токов: в концентрации 60 мкМ - $200 \pm 23\%$ (исходящий ток) и $378 \pm 65\%$ (входящий ток), 120 мкМ - $453 \pm 104\%$ (исходящий ток) и $719 \pm 98\%$ (входящий ток) (данные представлены в виде средних величин \pm S.D.) (рис. 34 В, Г). Применение Ueq 12-1 в концентрации 240 мкМ (в присутствии диклофенака) резко увеличивало исходящие и входящие токи, опосредованные TRPA1, до $835 \pm 566\%$ и $2559 \pm 959\%$ соответственно (рис. 34 В, Г). В концентрациях Ueq 12-1 выше 750 мкМ стандартного ответа TRPA1 на действие агониста не наблюдалось, что, вероятно, связано с утратой рецептором своих функций в присутствии пептида (рис. 34 Д). Потенцирующий эффект пептида также наблюдался для АИТС-индуцированных токов, опосредованных TRPA1 (рис. 34 Е). Ueq 12-1 в концентрации 60 мкМ не модулировал активность крысиного TRPV1 или человеческого TRPV3 во флуоресцентном анализе изменения концентрации кальция в стабильных клеточных линиях СНО, экспрессирующих эти рецепторы.

Таким образом, Ueq 12-1 значительно усиливал ответ TRPA1 на действие АИТС и диклофенака в кальциевом имиджинге и электрофизиологических экспериментах. Однако, получить классическую кривую дозозависимости потенцирующего эффекта не получилось (рис. 34 Б, Г), потому что пептид в высоких концентрациях полностью блокировал ответ рецептора.

4.4. Исследование биологической активности пептидов in vivo

Агонисты TRPA1 вызывают боль и нейрогенное воспаление, сопровождающееся тепловой и механической гипералгезией [20]. В связи с этим было проведено исследование с целью проверить могут ли пептиды Ms 9a-1 и Ueq 12-1 вызвать боль или тепловую гипералгезию. Через 2 часа после инъекции Ms 9a-1 или Ueq 12-1 (2,5 мкг в 10 мкл) в заднюю лапу у мышей не возникало болевых ощущений, отека лапы или термической гипералгезии. Пептиды не являлись агонистами рецептора и не вызывали боль, но предварительное введение Ms 9a-1 или Ueq 12-1 мышам значительно снижало

ноцицептивную реакцию, вызванную применением АТС (рис. 35 и 37), и СФА-индуцированную термическую гипералгезию и воспаление (рис. 36 и 37). Таким образом, применение пептидов *in vivo* изменяло воспалительный ответ.

В настоящее время известно о наличии анальгетических свойств у некоторых агонистов TRPA1. Например, было обнаружено, что такие активаторы TRPA1, как п-бензохинон (p-BQ) и N-ацетил-п-бензохинонимин (NAPQI), метаболиты ацетаминофена, являются мощными анальгетиками [147]. Эти метаболиты *in vitro* активируют TRPA1, экспрессируемый клетками HEK293 и DRG нейронами крысы, но в экспериментах *in vivo* они значительно снижают ноцицептивный ответ при интратекальном введении. Считается, что механизм спинальной анальгезии p-BQ и NAPQI заключается в активации TRPA1, которая приводит к блоку деполяризации, а также обширному и устойчивому ингибированию потенциал-зависимых кальциевых и натриевых каналов в DRG нейронах.

Аналогичный механизм действия обнаружен у частичного агониста TRPA1, партенолида, найденного в цветках и плодах пижмы (*Tanacetum parthenium*). Эта небольшая электрофильная молекула способна активировать TRPA1 в нейронах тройничного нерва и десенситизировать рецептор, после чего экспрессирующие TRPA1 нервные окончания не способны реагировать на другие раздражители. Стоит отметить, что партенолид вызывает ноцицептивную реакцию и аллодинию перед десенситизацией рецептора [126]. Другим примером является 15-дезоксид- $\Delta^{12,14}$ -простагландин J2, эндогенный электрофильный активатор TRPA1 [120], который при введении в лапы мышам вызывает антиноцицептивный эффект [127]. Таким образом, результат активации TRPA1 агонистами зависит от их химических свойств, которые определяют скорость десенситизации TRPA1 и способность нейронов отвечать на последующие вредные стимулы.

С учетом приведенных выше примеров можно предложить возможный механизм антиноцицептивного действия пептидов *in vivo*. Скорее всего, Ms 9a-1 и Ueq 12-1 уменьшают способность TRPA1-экспрессирующих нейронов реагировать на раздражающие стимулы. Эндогенные агонисты рецептора, такие как активные формы кислорода [88], простагландины [120,121], газотрансмиттеры NO [133] и H₂S [132], а также нитроксил анион (HNO) [134], индуцируют незначительную активацию TRPA1 в физиологических концентрациях, при этом пептиды могут потенцировать их действие

(рис. 36 и 37) и десенситизировать нейроны, экспрессирующие TRPA1, таким же образом, как и p-BQ, NARQI или партенолид. Десенситизированные нейроны не способны отвечать на действие селективного агониста TRPA1, что согласуется с анальгетическим эффектом у мышей в ответ на применение АИТС. Такой же эффект может быть достигнут после применения селективного антагониста TRPA1 в высоких концентрациях [276].

4.4.1. Исследование активности пептида Ms 9a-1 на мышах

Никаких изменений в поведении мышей в тесте «открытое поле» после внутривенного введения 0,3 мг/кг Ms 9a-1 обнаружено не было. Все основные параметры, такие как пройденное расстояние, подъем на задние лапы, скорость движения и время, проведенное в центральной и периферической зонах, были аналогичны показателям животных из контрольной группы.

Поскольку Ms 9a-1 значительно увеличивал ответ TRPA1 на действие АИТС *in vitro*, было решено проверить, может ли пептид модулировать ответ на применение этого агониста у мышей. Дозировка АИТС (10 мкл, 0,5% в физиологическом растворе) была подобрана так, чтобы вызвать примерно половину от максимального эффекта АИТС на количество облизываний и время поджатия лапы. Введение АИТС (10 мкл, 0,5% в физиологическом растворе) в подошву задней лапы мыши стимулировало интенсивное облизывание и поджатие инъецированной лапы, а также ее отек в результате нейрогенного воспаления, как описано ранее [276]. Внутривенное введение Ms 9a-1 (0,3 мг/кг) за 30 минут до инъекции агониста значительно снижало АИТС-индуцированное ноцицептивное поведение у мышей: уменьшалось время поджатия (~78%) (рис. 35 А) и количество облизываний лапы (~55%) (рис. 35 Б). Ms 9a-1 также влиял на развитие нейрогенного воспаления, уменьшая отек лапы на 42% и 50% по сравнению с контролем через 2 и 4 ч после инъекции АИТС соответственно (рис. 35 В). В концентрации 0,03 мг/кг не наблюдалось влияния пептида на ноцицептивный ответ.

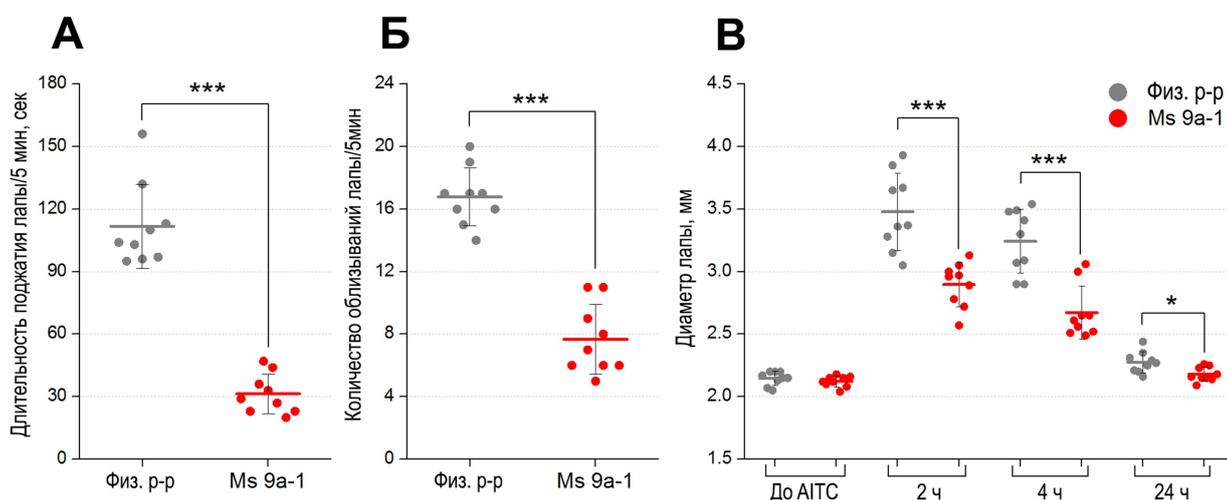


Рисунок 35. Эффективность Ms 9a-1 *in vivo* в модели АИТС-индуцированного болевого ответа. Предварительное введение мышам пептида Ms 9a-1 (0,3 мг/кг внутривенно) снижало реакцию на применение АИТС. Ms 9a-1 значительно сокращал длительность поджатия лапы (**А**) и количество облизываний лапы (**Б**), измеряемые в течение 5 минутного интервала после инъекции АИТС. **В.** Ms 9a-1 (0,3 мг/кг внутривенно) значительно уменьшал отек лапы после введения АИТС. Результаты представлены в виде средних значений \pm S.D., $n = 9$ для каждой группы; ***, $p < 0,001$; *, $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой (ANOVA тест с последующим тестом Тьюки).

Термическая гипералгезия, индуцированная полным адьювантом Фрейнда, является моделью воспалительного процесса. Инъекция СФА в заднюю лапу мыши вызывает отек лапы и повышенную чувствительность к механическим и термическим раздражителям (гипералгезия). Применение Ms 9a-1 (0,3 мг/кг внутривенно) значительно снижает термическую гипералгезию (на ~56%) в течение 30 мин после введения. Более того, пептид уменьшает отек лапы на 32, 35 и 39% по сравнению с контролем через 2, 4 и 24 часа после инъекции соответственно (рис. 36 А, Б). В концентрации 0,03 мг/кг эффекта Ms 9a-1 на развитие воспаления не наблюдалось. Применение селективного антагониста TRPA1, А-967079, (20 мг/кг перорально) за 1 ч до Ms 9a-1 полностью блокировало влияние пептида (0,3 мг/кг внутривенно) на СФА-индуцированную термическую гипералгезию (рис. 36 В). Следовательно, активация TRPA1 необходима для опосредованного пептидом ноцицептивного эффекта. Следует отметить, что в отличие от Ms 9a-1, антагонисты TRPA1, НС-030031 и А-967079, не влияют на СФА-индуцированную термическую гипералгезию [167,183]. Таким образом, действие Ms 9a-1 *in vivo* отличается от эффекта ингибирования TRPA1.

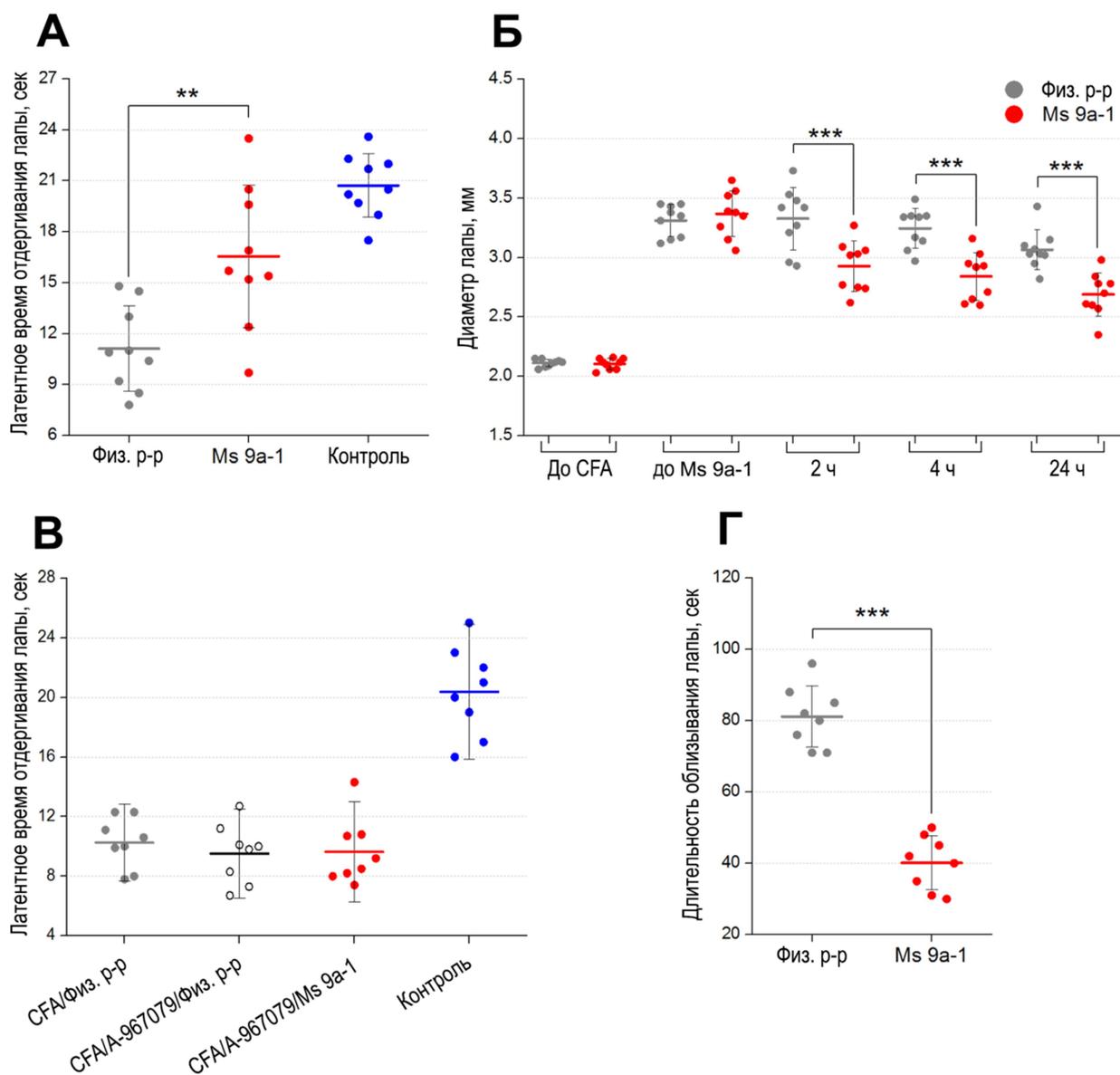


Рисунок 36. Эффективность Ms 9a-1 *in vivo* в тестах CFA-индуцированного воспаления и капсаицин-индуцированного болевого ответа. **А.** Влияние пептида Ms 9a-1 (0,3 мг/кг внутривенно) на длительность задержки перед отдергиванием лапы от горячей пластины в тесте CFA-индуцированной гипералгезии (n = 9 для каждой группы). **Б.** Влияние Ms 9a-1 (0,3 мг/кг внутривенно) на отек лапы, вызванный введением CFA (n = 9 для каждой группы). **В.** Селективный антагонист TRPA1, A-967079, (20 мг/кг перорально) блокировал влияние пептида Ms 9a-1 (0,3 мг/кг внутривенно) на термическую гипералгезию (n = 8 для каждой группы). **Г.** 0,3 мг/кг Ms 9a-1 значительно уменьшал ноцицептивную реакцию мышей на применение капсаицина (n = 8 для каждой группы). Результаты представлены в виде средних значений ±S.D.; ***, p < 0,001; **, p < 0,01 по сравнению с контрольной группой (ANOVA тест с последующим тестом Тьюки).

Капсаициновый рецептор TRPV1 ко-экспрессируется в чувствительных нейронах вместе с TRPA1 [8,20]. Считается, что TRPV1 играет ведущую роль в развитии CFA-индуцированной тепловой гипералгезии [247]. Внутривенное введение Ms 9a-1 (0,3 мг/кг) за 30 минут до инъекции капсаицина значительно снижало (на 50%) ноцицептивное поведение у мышей (рис. 36 Г). Данные об ингибировании пептидом капсаицин-индуцированного болевого ответа согласуются с результатами предыдущего исследования кросс-десенситизации агонистов TRPA1 и TRPV1[350]. Как было показано ранее с помощью *in vitro* анализа высвобождения нейропептидов и поведенческих анализов *in vivo*, горчичное масло (агонист TRPA1) вызывает снижение чувствительности периферических ноцицепторов к капсаицину [350].

Более того, партенолид, частичный агонист TRPA1, блокирует ответ на селективный агонист TRPV1, капсаицин, посредством десенситизации TRPA1-экспрессирующих нейронов [126]. Интратекальное введение агонистов TRPA1, коричневого альдегида, NAPQI и p-BQ, вызывает дозозависимое и обратимое увеличение задержки перед отдергиванием лапы от горячей пластины [147]. Таким образом, десенситизация TRPA1-экспрессирующих нейронов может приводить к ингибированию ответа на капсаицин и снижать воспаление и термическую гипералгезию, вызванные введением CFA.

4.4.2. Исследование активности пептида Ueq 12-1 на мышах

Для того чтобы спровоцировать ноцицептивную реакцию, связанную с активацией TRPA1, мышам вводили агонист рецептора, АИТС. Дозировка АИТС была подобрана так, чтобы вызвать примерно половину от максимального эффекта активации рецептора (20 мкл, 0,5% в физиологическом растворе). Внутривенное введение Ueq 12-1 (0,2 мг/кг) перед применением агониста значительно снижало АИТС-индуцированное ноцицептивное поведение у мышей. Количество облизываний и длительность поджатия лапы уменьшились на 49% и 43% соответственно (рис. 37 А). Кроме того, отек лапы, вызванный применением АИТС, снижался на 39% и 57% через 2 и 4 ч после инъекции соответственно (рис. 37 Б). Влияние Ueq 12-1 (0,2 мг/кг) на общий воспалительный процесс было исследовано с использованием модели воспаления после введения полного адьюванта Фрейнда (CFA). Воспаление провоцировали введением CFA в

заднюю лапу, и через 24 часа после инъекции мышам внутривенно вводили Ueq 12-1 (0,2 мг/кг). Пептид снижал термическую гипералгезию в течение 30 мин после инъекции (рис. 37 В) и уменьшал отека лапы на 27% через 24 часа после введения (рис. 37 Г).

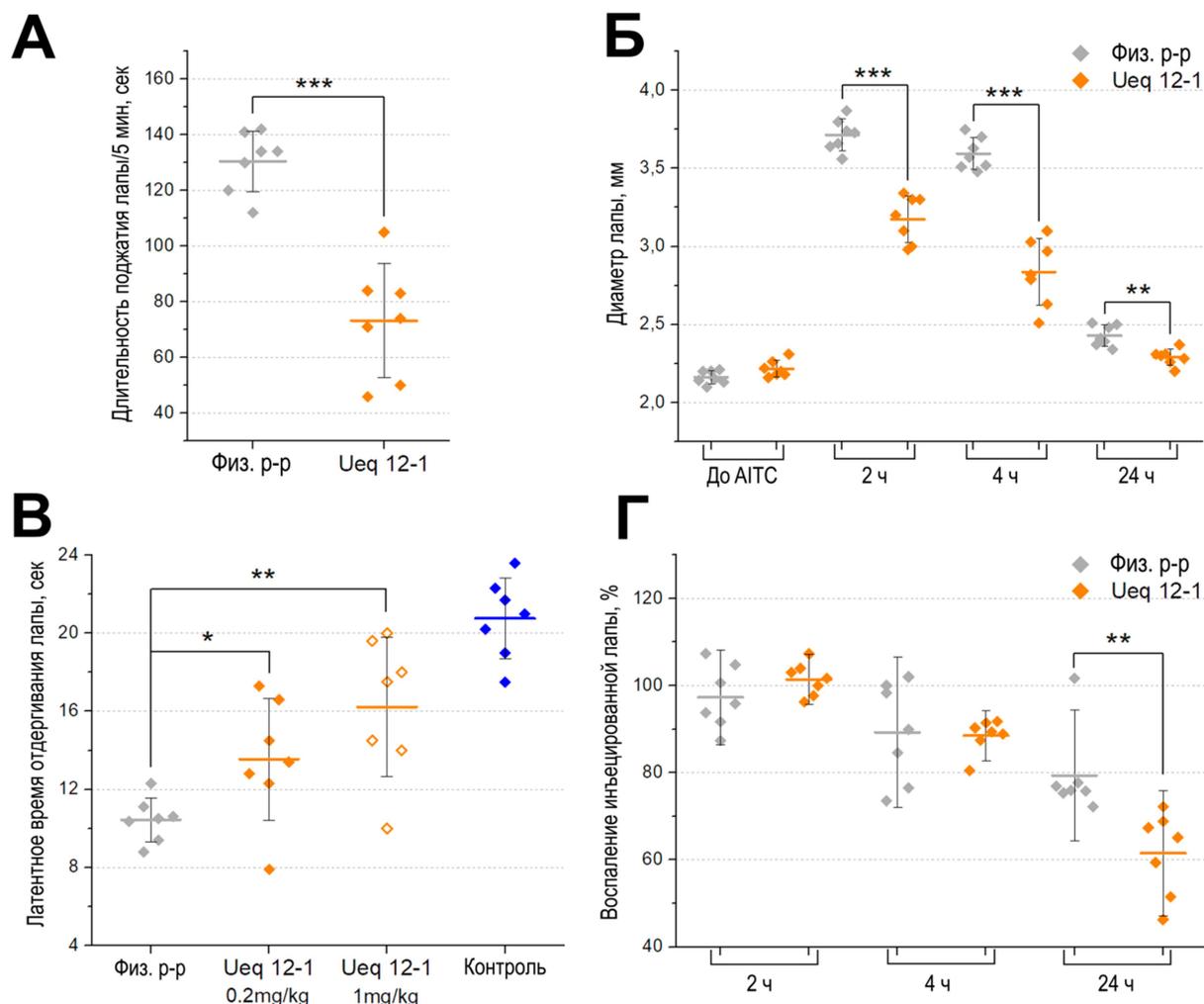


Рисунок 37. Эффективность Ueq 12-1 *in vivo* в тестах АИТС-индуцированного болевого ответа и СФА-индуцированного воспаления. **А.** Ueq 12-1 (0,2 мг/кг внутривенно) значительно снижал индуцированную инъекцией АИТС ноцицептивную реакцию (длительность поджатия лапы). **Б.** Ueq 12-1 (0,2 мг/кг внутривенно) значительно уменьшал отек лапы после введения АИТС. **В.** Влияние пептида Ueq 12-1 (0,2 мг/кг внутривенно) на длительность задержки перед отдергиванием лапы от горячей пластины в тесте СФА-индуцированной гипералгезии. **Г.** Влияние Ueq 12-1 (0,2 мг/кг внутривенно) на отек лапы, вызванный введением СФА. Результаты представлены в виде средних значений \pm S.D.; ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$; по сравнению с контрольной группой (ANOVA тест с последующим тестом Тьюки); $n = 7$ для всех экспериментов.

Предварительное применение селективного антагониста TRPA1, A-967079, (20 мг/кг, перорально) за 1 ч до пептида полностью блокировало влияние Ueq 12-1 (0,2 мг/кг, внутривенно) на CFA-индуцированное воспаление (рис. 38).

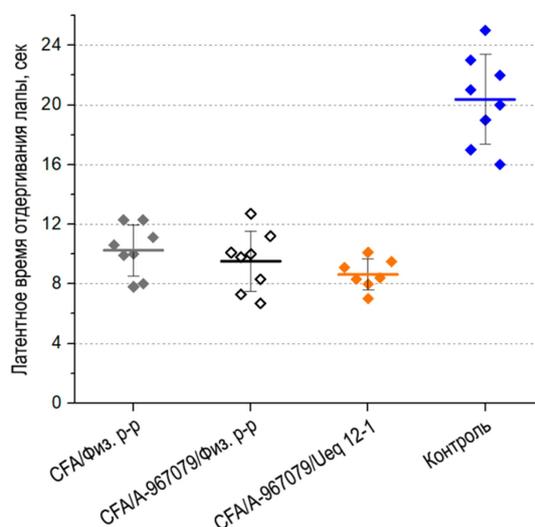


Рисунок 38. Селективный антагонист TRPA1, A-967079, (20 мг/кг перорально) полностью блокировал эффект пептида Ueq 12-1 (0,2 мг/кг внутривенно) на CFA-индуцируемую термическую гипералгезию (n = 7-8).

Наблюдаемый в поведенческих тестах эффект после инъекции пептида, не был результатом седации или нарушения поведения, поскольку введение Ueq 12-1 не влияло на нормальное поведение мышей в тесте «открытое поле» по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, пептид значительно снижал ноцицептивный ответа на АИТС, агонист TRPA1, и уменьшал гипералгезию и воспаление, вызванные введением CFA (рис. 37). Скорее всего, Ueq 12-1 потенцирует и десенситизирует рецептор TRPA1 на чувствительных нейронах или десенсибилизирует нейроны целиком. Ингибирование TRPA1 *in vivo* антагонистом A-967079 блокировало эффект Ueq 12-1 на термическую гипералгезию (рис. 38), в то время как антагонисты TRPA1 не влияют на тепловую гиперчувствительность при CFA-индуцированном воспалительном процессе [167,183]. Таким образом, активация TRPA1 имеет решающее значение для анальгетического действия Ueq 12-1. В экспериментах *in vitro* рецептор TRPA1 утрачивал свои функции в присутствии чрезвычайно высоких концентрациях пептида. Однако в организме млекопитающих содержится большое количество эндогенных модуляторов TRPA1,

которые влияют на активацию рецептора [351,352] и могут изменять чувствительность TRPA1 к пептиду, снижая действующую концентрацию. Помимо этого, Ueq 12-1 может, наподобие слабого активатора TRPA1, партенолида [126], увеличивать активацию TRPA1 под действием низких концентраций эндогенных агонистов, что приведет к слабой, но устойчивой активации рецептора и последующей десенситизации TRPA1-экспрессирующих нейронов. Таким образом, потенцирование или десенсибилизация ионных каналов TRPA1 может быть эффективным средством лечения боли и воспаления.

5. Заключение

Рецептор TRPA1 является чрезвычайно перспективной мишенью для разработки новых лекарственных препаратов для лечения различных патологических состояний, связанных с воспалительным процессом. Этот неселективный катионный канал экспрессируется в основном в чувствительных нейронах и активируется эндогенными лигандами, образующимися во время воспаления или окислительного стресса. Кроме того к агонистами рецептора относятся экзогенные электрофильные химические соединения, такие как АИТС, коричный альдегид, аллицин, акролеин [8,147,148,353,354] и некоторые другие вещества, например, ментол, НПВП и общие анестетики. Также TRPA1 можно активировать посредством фосфолипазы С (PLC путь) и протеинкиназы С (PKC-путь) [169]. Активация TRPA1 деполяризует мембрану чувствительных нейронов, инициируя боль, зуд и высвобождение провоспалительных пептидов, таких как вещество Р (SP) и кальцитонин-ген- связанный пептид (CGRP), провоцируя местный воспалительный ответ. Таким образом, активаторы TRPA1 вызывают нейропатическую боль и воспалительные ответы *in vivo* [118,355]. Более того, мутации в гена, кодирующем рецептор TRPA1, могут быть причиной аутосомно-доминантного синдрома эпизодической боли [172]. В норме TRPA1 считается хемосенсором и участвует в механочувствительности [356].

До настоящего времени было известно несколько антагонистов TRPA1: AP-18 [211], A-967079 [167], HC-030031 [278] и GRC 17536 [357]. В патентах [358] также описан ряд других ингибиторов рецептора. Перечисленные антагонисты являются низкомолекулярными соединениями, которые демонстрируют многообещающую активность *in vivo* в моделях повышенной гиперчувствительности и термической гипералгезии на животных, однако эффективные дозы этих ингибиторов слишком высоки для разработки лекарственных препаратов. Исключением является GRC 17536, который находится в Фазе 2 клинических испытаниях на пациентах, страдающих от диабетических нейропатий и респираторных заболеваний.

Несмотря на то, что ингибирование TRPA1 представляется наиболее логичной стратегией устранения болевых ощущений при воспалительных и нейропатических состояниях, было показано, что подкожное, внутривенное или интратекальное введение некоторых активаторов TRPA1 также может нарушать ноцицептивную сигнализацию

[126,127,147,359]. Следовательно, конечный результат активации TRPA1 в значительной степени зависит от места применения агониста и степени активации TRPA1. Анальгетический эффект, опосредованный активацией рецептора, может лежать в основе фармакологического действия некоторых нестероидных противовоспалительных препаратов (ацетаминофена, фенаматов, арилалкановых кислот) [147,148] и экстракта пижмы [126]. Выделенные в данной работе новые пептиды из ядов морских анемонов, являются доказательством того, что потенцирование TRPA1 также может иметь положительный эффект при патологических состояниях.

Пептид τ -AnmTX Ms 9a-1 из яда актинии *M. senile* обладает уникальными свойствами: он действует как позитивный модулятор, значительно увеличивая ответ TRPA1 на применение различных агонистов *in vitro*, и обладает антиноцицептивным и противовоспалительным эффектами *in vivo*. Другой пептид τ -AnmTx Ueq 12-1 из яда актинии *U. eques* является одним из основных компонентов эктодермального секрета. Молекула имеет уникальную пространственную структуру, обладает антибактериальной активностью, потенцирует TRPA1 *in vitro* и проявляет анальгетический эффект в моделях ноцицептивной боли у мышей. Пептиды, по-видимому, в природе выполняют защитные функции. Антибактериальная активность может быть полезна для уменьшения вероятности заражения при повреждении *in vivo*, а модулирование TRP каналов может вводить в заблуждение жертву, хищников или конкурирующие виды на морском дне. TRPA1-подобные белки очень консервативны и участвуют в процессах механочувствительности и ответной реакции на действие внешних раздражителей [351]. Например, TRPA1-подобные ионные каналы морских анемонов ответственны за разряд нематоцитов при вибрации [360].

Механизм действия пептидов Ms 9a-1 и Ueq 12-1 может представлять собой новую терапевтическую стратегию: потенцирование TRPA1 приводит к ингибированию нейрогенного воспалительного ответа, вследствие десенситизации TRPA1-экспрессирующих нейронов. Потенцирование рецептора индуцирующее анальгетический эффект является привлекательным способом модулирования активности TRPA1, поскольку существующие ингибиторы имеют слишком высокие эффективные дозы ($ED_{50} > 20$ мг/кг) [183,278], тогда как известные частичные агонисты вызывают боль. Более того, Ms 9a-1 может служить инструментом в исследовании участия TRPA1-экспрессирующих нейронов в физиологических и патологических

состояниях, а Ueq 12-1 можно рассматривать как потенциальный анальгетический препарат с антибактериальными свойствами.

6. Выводы

1. Из ядов актиний *M. senile* и *U. eques* выделены два новых пептида Ms 9a-1 и Ueq 12-1, которые обладают потенцирующим действием на агонист-активированный рецептор TRPA1.
2. Установлена первичная последовательность пептидов Ms 9a-1 и Ueq 12-1 и разработана система получения их рекомбинантных аналогов в бактериальной системе экспрессии.
3. Определена уникальная пространственная структура пептида Ueq 12-1, который стал первым представителем нового класса токсином морских анемонов.
4. Исследование биологической активности пептидов Ms 9a-1 и Ueq 12-1 показало, что они являются первыми пептидными потенциаторами TRPA1 и увеличивают агонист-индуцированный ответ этого рецептора в электрофизиологических экспериментах и кальциевом имиджинге.
5. Выявлены анальгетические и противовоспалительные свойства пептидов Ms 9a-1 и Ueq 12-1. Внутривенное введение пептидов Ms 9a-1 (0,3 мг/кг) и Ueq 12-1 (0,2 мг/кг) значительно ослабляет болевой ответ, вызываемый аллилизотиоцианатом - селективным агонистом TRPA1, а также воспаление и тепловую гиперчувствительность вызванные CFA.

7. Список сокращений

- 4-HNE - 4-гидроксиноненал или 4-гидрокси-2-ноненал;
- AITC - аллилизотиоцианат;
- AR – анкириновый повтор;
- ASIC – протон-чувствительные ионные каналы,
- CBS – кальцитонин-связывающий домен;
- CFA – полный адъювант Фрейнда;
- CGRP – кальцитонин-ген- связанный пептид;
- c-Ret – ген, кодирующий рецепторную тирозинкиназу глиальных клеток;
- DRG – ганглий корешков спинного мозга,
- DTT (ДТТ) – (1,4-)дитиотреитол;
- ESC – внеклеточный раствор;
- GDNF - глиальный нейротрофический фактор;
- HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоновая кислота;
- IB4 - изолектин-B4;
- MALDI (МАЛДИ) – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация;
- MES – 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота;
- MIC - минимальная ингибирующая концентрация;
- Mrg (MrgprA3; MrgprC11) – Mas-родственные рецепторы, сопряжённые с G-белком;
- NG - узловатый ганглий;
- NGF - фактор роста нервов;
- P2X3 – P2X пуринергический рецептор 3;
- PACSIN3 – фермент протеинкиназа C и субстрат казеиновой киназы в белке нейронов 3;
- PLC – фосфолипаза C;
- RACE – быстрая амплификация концов кДНК;
- RTK (TrkA) – нейротрофная рецепторная тирозинкиназа 1;
- S1–S6 – трансмембранные сегменты с 1 по 6;
- SCRiPs - малые цистеин-богатые пептиды;
- SP – вещество P;

SPE - твердофазная экстракция;
TCEP - трис(2-карбоксиэтил) фосфин;
TG - тригеминальный узел;
TRPA (ANKTM) – анкириновый рецептор временного потенциала;
TRPC - канонический рецептор временного потенциала;
TRPM - меластатиновый рецептор временного потенциала;
TRPML - микопилиновый рецептор временного потенциала;
TRPN – подобный каноническим рецептор временного потенциала без механотрансдукции;
TRPP - полицистиновый рецептор временного потенциала;
TRPV - ванилоидный рецептор временного потенциала;
TrpY1 (Yvc1) – trp-подобный ген в дрожжах;
Trx – тиоредоксин;
а.о. – аминокислотные остатки;
АТФ – аденозинтрифосфат;
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;
ИПТГ – изопропил-1-тио-β-D-галактопиранозид;
кДНК – комплементарная ДНК;
кРНК — комплементарная РНК;
МС – масс-спектрометрия;
ОФ-ВЭЖХ – обращенно-фазовая ВЭЖХ;
п.о. – пары оснований;
ПЦР – полимеразная цепная реакция;
Трис – трис(гидроксиметил)аминометан;
ТФУ – трифторуксусная кислота;
ЦНС – центральная нервная система;
ЦНС – центральная нервная система;
ЭДТА – этилендиаминтетраацетат;
ЯМР – ядерный магнитный резонанс.

ССЫЛКИ

1. Koltzenburg M., Lundberg L.E., Torebjork H.E. Dynamic and static components of mechanical hyperalgesia in human hairy skin // *Pain*. 1992. Vol. 51, № 2. P. 207–219.
2. Namer B. et al. TRPA1 and TRPM8 activation in humans: effects of cinnamaldehyde and menthol // *Neuroreport*. 2005. Vol. 16, № 9. P. 955–959.
3. Olausson B. Recordings of human polymodal single C-fiber afferents following mechanical and argon-laser heat stimulation of inflamed skin // *Exp Brain Res*. 1998. Vol. 122, № 1. P. 55–61.
4. Cevikbas F. et al. A sensory neuron-expressed IL-31 receptor mediates T helper cell-dependent itch: Involvement of TRPV1 and TRPA1 // *J Allergy Clin Immunol*. 2014. Vol. 133, № 2. P. 448–460.
5. Liu B. et al. TRPA1 controls inflammation and pruritogen responses in allergic contact dermatitis // *FASEB J*. 2013. Vol. 27, № 9. P. 3549–3563.
6. Oh M.H. et al. TRPA1-dependent pruritus in IL-13-induced chronic atopic dermatitis // *J Immunol*. 2013. Vol. 191, № 11. P. 5371–5382.
7. Wilson S.R. et al. The ion channel TRPA1 is required for chronic itch // *J Neurosci*. 2013. Vol. 33, № 22. P. 9283–9294.
8. Andre E. et al. Cigarette smoke-induced neurogenic inflammation is mediated by alpha,beta-unsaturated aldehydes and the TRPA1 receptor in rodents // *J Clin Invest*. 2008. Vol. 118, № 7. P. 2574–2582.
9. Bessac B.F. et al. Transient receptor potential ankyrin 1 antagonists block the noxious effects of toxic industrial isocyanates and tear gases // *FASEB J*. 2009. Vol. 23, № 4. P. 1102–1114.
10. Bessac B.F. et al. TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons // *J Clin Invest*. 2008. Vol. 118, № 5. P. 1899–1910.
11. Obata K. et al. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury // *J Clin Invest*. 2005. Vol. 115, № 9. P. 2393–2401.
12. Dolovich J., Back N., Arbesman C.E. Kinin-like activity in nasal secretions of

- allergic patients // *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1970. Vol. 38, № 4. P. 337–344.
13. Winterbourn C.C., Kettle A.J. Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid // *Free Radic Biol Med.* 2000. Vol. 29, № 5. P. 403–409.
 14. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications // *Nature.* 2001. Vol. 414, № 6865. P. 813–820.
 15. Nakayama K. et al. Plasma alpha-oxoaldehyde levels in diabetic and nondiabetic chronic kidney disease patients // *Am J Nephrol.* 2008. Vol. 28, № 6. P. 871–878.
 16. Andersson D.A. et al. Methylglyoxal evokes pain by stimulating TRPA1 // *PLoS One.* 2013. Vol. 8, № 10. P. e77986.
 17. Eberhardt M.J. et al. Methylglyoxal activates nociceptors through transient receptor potential channel A1 (TRPA1): a possible mechanism of metabolic neuropathies // *J Biol Chem.* 2012. Vol. 287, № 34. P. 28291–28306.
 18. Engel M.A. et al. The proximodistal aggravation of colitis depends on substance P released from TRPV1-expressing sensory neurons // *J Gastroenterol.* 2012. Vol. 47, № 3. P. 256–265.
 19. Engel M.A. et al. TRPA1 and substance P mediate colitis in mice // *Gastroenterology.* 2011. Vol. 141, № 4. P. 1346–1358.
 20. Bautista D.M. et al. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents // *Cell.* 2006. Vol. 124, № 6. P. 1269–1282.
 21. Lozano-Ondoua A.N., Symons-Liguori A.M., Vanderah T.W. Cancer-induced bone pain: Mechanisms and models // *Neurosci Lett.* 2013. Vol. 557 Pt A. P. 52–59.
 22. Ye Y. et al. Nerve growth factor links oral cancer progression, pain, and cachexia // *Mol Cancer Ther.* 2011. Vol. 10, № 9. P. 1667–1676.
 23. Hamilton N.B. et al. Proton-gated Ca(2+)-permeable TRP channels damage myelin in conditions mimicking ischaemia // *Nature.* 2016. Vol. 529, № 7587. P. 523–527.
 24. Gui J. et al. A tarantula-venom peptide antagonizes the TRPA1 nociceptor ion channel by binding to the S1-S4 gating domain // *Curr Biol.* 2014. Vol. 24, № 5. P. 473–483.
 25. Tonello R. et al. Phalpa1beta acts as a TRPA1 antagonist with antinociceptive effects in mice. // *Br. J. Pharmacol.* 2016.

26. Basbaum A.I., Jessell T. The perception of pain. // *Princ. Neurosci.* E.R. Kandel, J. Schwartz, T. Jessell, eds. (New York Applet. Lange). 2000. P. 472–491.
27. Nagata K. et al. Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing // *J Neurosci.* 2005. Vol. 25, № 16. P. 4052–4061.
28. Meyer Ringkamp, M., Campbell, J.N., Raja, S.N. R.A. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception // *Wall Melzack's Textb. Pain*, S.B. McMahon M. Koltzenburg, eds. (Philadelphia Elsevier). 2008. P. 3–34.
29. Perl E.R. Ideas about pain, a historical view // *Nat Rev Neurosci.* 2007. Vol. 8, № 1. P. 71–80.
30. Schmidt R. et al. Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin // *J Neurosci.* 1995. Vol. 15, № 1 Pt 1. P. 333–341.
31. Olausson H. et al. Functional role of unmyelinated tactile afferents in human hairy skin: sympathetic response and perceptual localization // *Exp Brain Res.* 2008. Vol. 184, № 1. P. 135–140.
32. Snider W.D., McMahon S.B. Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors // *Neuron.* 1998. Vol. 20, № 4. P. 629–632.
33. Dong X. et al. A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons // *Cell.* 2001. Vol. 106, № 5. P. 619–632.
34. Julius D., Basbaum A.I. Molecular mechanisms of nociception // *Nature.* 2001. Vol. 413, № 6852. P. 203–210.
35. Wu L.J., Sweet T.B., Clapham D.E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family // *Pharmacol Rev.* 2010. Vol. 62, № 3. P. 381–404.
36. Cosens D.J., Manning A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant // *Nature.* 1969. Vol. 224, № 5216. P. 285–287.
37. Montell C., Rubin G.M. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction // *Neuron.* 1989. Vol. 2, № 4. P. 1313–1323.
38. Hardie R.C., Minke B. The trp gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in *Drosophila* photoreceptors // *Neuron.* 1992. Vol. 8, № 4. P. 643–651.
39. Hardie R.C. et al. Novel potassium channels encoded by the Shaker locus in *Drosophila* photoreceptors // *Neuron.* 1991. Vol. 6, № 3. P. 477–486.

40. Phillips A.M., Bull A., Kelly L.E. Identification of a *Drosophila* gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the *trp* phototransduction gene // *Neuron*. 1992. Vol. 8, № 4. P. 631–642.
41. Niemeyer B.A. et al. The *Drosophila* light-activated conductance is composed of the two channels TRP and TRPL // *Cell*. 1996. Vol. 85, № 5. P. 651–659.
42. Reuss H. et al. In vivo analysis of the *drosophila* light-sensitive channels, TRP and TRPL // *Neuron*. 1997. Vol. 19, № 6. P. 1249–1259.
43. Gillo B. et al. Coexpression of *Drosophila* TRP and TRP-like proteins in *Xenopus* oocytes reconstitutes capacitative Ca²⁺ entry // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996. Vol. 93, № 24. P. 14146–14151.
44. Hardie R.C. et al. Functional equivalence of native light-sensitive channels in the *Drosophila* *trp301* mutant and TRPL cation channels expressed in a stably transfected *Drosophila* cell line // *Cell Calcium*. 1997. Vol. 21, № 6. P. 431–440.
45. Vaca L. et al. Activation of recombinant *trp* by thapsigargin in Sf9 insect cells // *Am J Physiol*. 1994. Vol. 267, № 5 Pt 1. P. C1501-5.
46. Xu X.Z. et al. Coassembly of TRP and TRPL produces a distinct store-operated conductance // *Cell*. 1997. Vol. 89, № 7. P. 1155–1164.
47. Hardie R.C. et al. Calcium influx via TRP channels is required to maintain PIP₂ levels in *Drosophila* photoreceptors // *Neuron*. 2001. Vol. 30, № 1. P. 149–159.
48. Montell C. Visual transduction in *Drosophila* // *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1999. Vol. 15. P. 231–268.
49. Sidi S., Friedrich R.W., Nicolson T. NompC TRP channel required for vertebrate sensory hair cell mechanotransduction // *Science* (80-.). 2003. Vol. 301, № 5629. P. 96–99.
50. Wheeler G.L., Brownlee C. Ca²⁺ signalling in plants and green algae--changing channels // *Trends Plant Sci*. 2008. Vol. 13, № 9. P. 506–514.
51. Myers B.R., Bohlen C.J., Julius D. A yeast genetic screen reveals a critical role for the pore helix domain in TRP channel gating // *Neuron*. 2008. Vol. 58, № 3. P. 362–373.
52. Su Z. et al. Yeast gain-of-function mutations reveal structure-function relationships conserved among different subfamilies of transient receptor potential channels // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007. Vol. 104, № 49. P. 19607–19612.

53. Zhou X. et al. Yeast screens show aromatic residues at the end of the sixth helix anchor transient receptor potential channel gate // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007. Vol. 104, № 39. P. 15555–15559.
54. Chang Y. et al. Properties of the intracellular transient receptor potential (TRP) channel in yeast, Yvc1 // *FEBS Lett*. 2010. Vol. 584, № 10. P. 2028–2032.
55. Su Z. et al. The use of yeast to understand TRP-channel mechanosensitivity // *Pflugers Arch*. 2009. Vol. 458, № 5. P. 861–867.
56. Su Z. et al. Mechanical force and cytoplasmic Ca(2+) activate yeast TRPY1 in parallel // *J Membr Biol*. 2009. Vol. 227, № 3. P. 141–150.
57. Denis V., Cyert M.S. Internal Ca(2+) release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue // *J Cell Biol*. 2002. Vol. 156, № 1. P. 29–34.
58. Palmer C.P. et al. A TRP homolog in *Saccharomyces cerevisiae* forms an intracellular Ca(2+)-permeable channel in the yeast vacuolar membrane // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001. Vol. 98, № 14. P. 7801–7805.
59. Cai X. Unicellular Ca²⁺ signaling “toolkit” at the origin of metazoa // *Mol Biol Evol*. 2008. Vol. 25, № 7. P. 1357–1361.
60. Mio K. et al. The TRPC3 channel has a large internal chamber surrounded by signal sensing antennas // *J Mol Biol*. 2007. Vol. 367, № 2. P. 373–383.
61. Liao M. et al. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy // *Nature*. 2013. Vol. 504, № 7478. P. 107–112.
62. Zubcevic L. et al. Cryo-electron microscopy structure of the TRPV2 ion channel // *Nat Struct Mol Biol*. 2016.
63. Paulsen C.E. et al. Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms // *Nature*. 2015. Vol. 520, № 7548. P. 511–517.
64. Yu Y. et al. Structural and molecular basis of the assembly of the TRPP2/PKD1 complex // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009. Vol. 106, № 28. P. 11558–11563.
65. Cheng W., Sun C., Zheng J. Heteromerization of TRP channel subunits: extending functional diversity // *Protein Cell*. 2010. Vol. 1, № 9. P. 802–810.
66. Hanson S.M., Sansom M.S., Becker E.B. Modeling Suggests TRPC3 Hydrogen Bonding and Not Phosphorylation Contributes to the Ataxia Phenotype of the Moonwalker Mouse // *Biochemistry*. 2015. Vol. 54, № 26. P. 4033–4041.

67. Eder P., Molkentin J.D. TRPC channels as effectors of cardiac hypertrophy // *Circ Res*. 2011. Vol. 108, № 2. P. 265–272.
68. Gaudet R. TRP channels entering the structural era // *J Physiol*. 2008. Vol. 586, № Pt 15. P. 3565–3575.
69. Owsianik G. et al. Structure-function relationship of the TRP channel superfamily // *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2006. Vol. 156. P. 61–90.
70. Perraud A.L. et al. ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology // *Nature*. 2001. Vol. 411, № 6837. P. 595–599.
71. Yamaguchi H. et al. Crystal structure of the atypical protein kinase domain of a TRP channel with phosphotransferase activity // *Mol Cell*. 2001. Vol. 7, № 5. P. 1047–1057.
72. Gaudet R. A primer on ankyrin repeat function in TRP channels and beyond // *Mol Biosyst*. 2008. Vol. 4, № 5. P. 372–379.
73. Phelps C.B. et al. Differential regulation of TRPV1, TRPV3, and TRPV4 sensitivity through a conserved binding site on the ankyrin repeat domain // *J Biol Chem*. 2010. Vol. 285, № 1. P. 731–740.
74. Tsuruda P.R., Julius D., Minor Jr. D.L. Coiled coils direct assembly of a cold-activated TRP channel // *Neuron*. 2006. Vol. 51, № 2. P. 201–212.
75. Cheng X. et al. Mucolipins: Intracellular TRPML1-3 channels // *FEBS Lett*. 2010. Vol. 584, № 10. P. 2013–2021.
76. Cuajungco M.P. et al. PACSINs bind to the TRPV4 cation channel. PACSIN 3 modulates the subcellular localization of TRPV4 // *J Biol Chem*. 2006. Vol. 281, № 27. P. 18753–18762.
77. Gonzales A.L. et al. A PLCgamma1-dependent, force-sensitive signaling network in the myogenic constriction of cerebral arteries // *Sci Signal*. 2014. Vol. 7, № 327. P. ra49.
78. Gees M., Colsoul B., Nilius B. The role of transient receptor potential cation channels in Ca²⁺ signaling // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010. Vol. 2, № 10. P. a003962.
79. Peier A.M. et al. A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes // *Science* (80-.). 2002. Vol. 296, № 5575. P. 2046–2049.
80. Xu H. et al. TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel //

- Nature. 2002. Vol. 418, № 6894. P. 181–186.
81. Sałat K., Moniczewski A., Librowski T. Transient receptor potential channels - emerging novel drug targets for the treatment of pain. // *Curr. Med. Chem.* 2013. Vol. 20, № 11. P. 1409–1436.
 82. Schenker T., Trueb B. Down-regulated proteins of mesenchymal tumor cells // *Exp Cell Res.* 1998. Vol. 239, № 1. P. 161–168.
 83. Jaquemar D., Schenker T., Trueb B. An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts // *J Biol Chem.* 1999. Vol. 274, № 11. P. 7325–7333.
 84. Story G.M. et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures // *Cell.* 2003. Vol. 112, № 6. P. 819–829.
 85. Corey D.P. et al. TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells // *Nature.* 2004. Vol. 432, № 7018. P. 723–730.
 86. Bandell M. et al. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin // *Neuron.* 2004. Vol. 41, № 6. P. 849–857.
 87. Jordt S.E. et al. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1 // *Nature.* 2004. Vol. 427, № 6971. P. 260–265.
 88. Trevisani M. et al. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1 // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007. Vol. 104, № 33. P. 13519–13524.
 89. Tracey Jr. W.D. et al. *painless*, a *Drosophila* gene essential for nociception // *Cell.* 2003. Vol. 113, № 2. P. 261–273.
 90. Lee Y. et al. *Pyrexia* is a new thermal transient receptor potential channel endowing tolerance to high temperatures in *Drosophila melanogaster* // *Nat Genet.* 2005. Vol. 37, № 3. P. 305–310.
 91. Rosenzweig M. et al. The *Drosophila* ortholog of vertebrate TRPA1 regulates thermotaxis // *Genes Dev.* 2005. Vol. 19, № 4. P. 419–424.
 92. Sokabe T. et al. *Drosophila* *painless* is a Ca²⁺-requiring channel activated by noxious heat // *J Neurosci.* 2008. Vol. 28, № 40. P. 9929–9938.
 93. Kang K. et al. Analysis of *Drosophila* TRPA1 reveals an ancient origin for human chemical nociception // *Nature.* 2010. Vol. 464, № 7288. P. 597–600.
 94. Bianchi B.R. et al. Species comparison and pharmacological characterization of

- human, monkey, rat, and mouse TRPA1 channels // *J Pharmacol Exp Ther.* 2012. Vol. 341, № 2. P. 360–368.
95. Gray M.J. et al. Polyphosphate is a primordial chaperone // *Mol Cell.* 2014. Vol. 53, № 5. P. 689–699.
 96. Kim D., Cavanaugh E.J. Requirement of a soluble intracellular factor for activation of transient receptor potential A1 by pungent chemicals: role of inorganic polyphosphates // *J Neurosci.* 2007. Vol. 27, № 24. P. 6500–6509.
 97. Rohacs T. Phosphoinositide regulation of TRP channels // *Handb Exp Pharmacol.* 2014. Vol. 223. P. 1143–1176.
 98. Cao E. et al. TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms // *Nature.* 2013. Vol. 504, № 7478. P. 113–118.
 99. Hasan R. et al. Calmodulin is responsible for Ca²⁺-dependent regulation of TRPA1 Channels // *Sci. Rep. Nature Publishing Group,* 2017. Vol. 7, № February. P. 45098.
 100. Macpherson L.J. et al. Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines // *Nature.* 2007. Vol. 445, № 7127. P. 541–545.
 101. Hinman A. et al. TRP channel activation by reversible covalent modification // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006. Vol. 103, № 51. P. 19564–19568.
 102. Moparthi L. et al. Human TRPA1 is intrinsically cold- and chemosensitive with and without its N-terminal ankyrin repeat domain // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014. Vol. 111, № 47. P. 16901–16906.
 103. Chen J. et al. Molecular determinants of species-specific activation or blockade of TRPA1 channels // *J Neurosci.* 2008. Vol. 28, № 19. P. 5063–5071.
 104. Chen J., Hackos D.H. TRPA1 as a drug target--promise and challenges // *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2015. Vol. 388, № 4. P. 451–463.
 105. Cordero-Morales J.F., Gracheva E.O., Julius D. Cytoplasmic ankyrin repeats of transient receptor potential A1 (TRPA1) dictate sensitivity to thermal and chemical stimuli // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011. Vol. 108, № 46. P. E1184-91.
 106. Wilson S.R. et al. TRPA1 is required for histamine-independent, Mas-related G protein-coupled receptor-mediated itch // *Nat Neurosci.* 2011. Vol. 14, № 5. P. 595–602.
 107. Payandeh J. et al. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel // *Nature.*

2011. Vol. 475, № 7356. P. 353–358.
108. Long S.B., Campbell E.B., Mackinnon R. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel // *Science* (80-.). 2005. Vol. 309, № 5736. P. 897–903.
 109. Susankova K. et al. Contribution of the putative inner-pore region to the gating of the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel (TRPV1) // *J Neurosci*. 2007. Vol. 27, № 28. P. 7578–7585.
 110. Voets T. et al. Outer pore architecture of a Ca²⁺-selective TRP channel // *J Biol Chem*. 2004. Vol. 279, № 15. P. 15223–15230.
 111. Klement G. et al. Characterization of a ligand binding site in the human transient receptor potential ankyrin 1 pore // *Biophys J*. 2013. Vol. 104, № 4. P. 798–806.
 112. Nakatsuka K. et al. Identification of molecular determinants for a potent mammalian TRPA1 antagonist by utilizing species differences // *J Mol Neurosci*. 2013. Vol. 51, № 3. P. 754–762.
 113. Marsakova L. et al. The First Extracellular Linker Is Important for Several Aspects of the Gating Mechanism of Human TRPA1 Channel // *Front. Mol. Neurosci*. 2017. Vol. 10, № January. P. 16.
 114. Bautista D.M. et al. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1 // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005. Vol. 102, № 34. P. 12248–12252.
 115. Macpherson L.J. et al. The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin // *Curr Biol*. 2005. Vol. 15, № 10. P. 929–934.
 116. Ibarra Y., Blair N.T. Benzoquinone reveals a cysteine-dependent desensitization mechanism of TRPA1 // *Mol Pharmacol*. 2013. Vol. 83, № 5. P. 1120–1132.
 117. Wang L. et al. Identification of in vivo disulfide conformation of TRPA1 ion channel // *J Biol Chem*. 2012. Vol. 287, № 9. P. 6169–6176.
 118. Taylor-Clark T.E. et al. Relative contributions of TRPA1 and TRPV1 channels in the activation of vagal bronchopulmonary C-fibres by the endogenous autacoid 4-oxononenal // *J Physiol*. 2008. Vol. 586, № Pt 14. P. 3447–3459.
 119. Trevisan G. et al. TRPA1 receptor stimulation by hydrogen peroxide is critical to trigger hyperalgesia and inflammation in a model of acute gout // *Free Radic Biol Med*. 2014. Vol. 72. P. 200–209.
 120. Andersson D.A. et al. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for

- multiple products of oxidative stress // *J Neurosci*. 2008. Vol. 28, № 10. P. 2485–2494.
121. Cruz-Orengo L. et al. Cutaneous nociception evoked by 15-delta PGJ2 via activation of ion channel TRPA1 // *Mol Pain*. 2008. Vol. 4. P. 30.
 122. Taylor-Clark T.E. et al. TRPA1: a potential target for anti-tussive therapy // *Pulm Pharmacol Ther*. 2009. Vol. 22, № 2. P. 71–74.
 123. Motter A.L., Ahern G.P. TRPA1 is a polyunsaturated fatty acid sensor in mammals // *PLoS One*. 2012. Vol. 7, № 6. P. e38439.
 124. Gouin O. et al. TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization // *Protein Cell*. Higher Education Press, 2017.
 125. Zhong J. et al. Umbellulone modulates TRP channels // *Pflugers Arch*. 2011. Vol. 462, № 6. P. 861–870.
 126. Materazzi S. et al. Parthenolide inhibits nociception and neurogenic vasodilatation in the trigeminovascular system by targeting the TRPA1 channel // *Pain*. 2013. Vol. 154, № 12. P. 2750–2758.
 127. Weng Y. et al. Prostaglandin metabolite induces inhibition of TRPA1 and channel-dependent nociception // *Mol Pain*. 2012. Vol. 8. P. 75.
 128. Dai Y. et al. Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain // *J Clin Invest*. 2007. Vol. 117, № 7. P. 1979–1987.
 129. Lieu T. et al. The bile acid receptor TGR5 activates the TRPA1 channel to induce itch in mice // *Gastroenterology*. 2014. Vol. 147, № 6. P. 1417–1428.
 130. Wang S. et al. Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain // *Brain*. 2008. Vol. 131, № Pt 5. P. 1241–1251.
 131. Wilson S.R. et al. The epithelial cell-derived atopic dermatitis cytokine TSLP activates neurons to induce itch // *Cell*. 2013. Vol. 155, № 2. P. 285–295.
 132. Andersson D.A., Gentry C., Bevan S. TRPA1 has a key role in the somatic pro-nociceptive actions of hydrogen sulfide // *PLoS One*. 2012. Vol. 7, № 10. P. e46917.
 133. Takahashi N. et al. Molecular characterization of TRPA1 channel activation by cysteine-reactive inflammatory mediators // *Channels (Austin)*. 2008. Vol. 2, № 4.

- P. 287–298.
134. Eberhardt M. et al. H₂S and NO cooperatively regulate vascular tone by activating a neuroendocrine HNO-TRPA1-CGRP signalling pathway // *Nat Commun.* 2014. Vol. 5. P. 4381.
 135. Takahashi N. et al. TRPA1 underlies a sensing mechanism for O₂ // *Nat Chem Biol.* 2011. Vol. 7, № 10. P. 701–711.
 136. de la Roche J. et al. The molecular basis for species-specific activation of human TRPA1 protein by protons involves poorly conserved residues within transmembrane domains 5 and 6 // *J Biol Chem.* 2013. Vol. 288, № 28. P. 20280–20292.
 137. Wang Y.Y. et al. A TRPA1-dependent mechanism for the pungent sensation of weak acids // *J Gen Physiol.* 2011. Vol. 137, № 6. P. 493–505.
 138. Wang Y.Y., Chang R.B., Liman E.R. TRPA1 is a component of the nociceptive response to CO₂ // *J Neurosci.* 2010. Vol. 30, № 39. P. 12958–12963.
 139. Fujita F. et al. Intracellular alkalization causes pain sensation through activation of TRPA1 in mice // *J Clin Invest.* 2008. Vol. 118, № 12. P. 4049–4057.
 140. Wang Y.Y. et al. The nociceptor ion channel TRPA1 is potentiated and inactivated by permeating calcium ions // *J Biol Chem.* 2008. Vol. 283, № 47. P. 32691–32703.
 141. Zurborg S. et al. Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca²⁺ // *Nat Neurosci.* 2007. Vol. 10, № 3. P. 277–279.
 142. Doerner J.F. et al. Transient receptor potential channel A1 is directly gated by calcium ions // *J Biol Chem.* 2007. Vol. 282, № 18. P. 13180–13189.
 143. Andrade E.L., Meotti F.C., Calixto J.B. TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs // *Pharmacol Ther.* 2012. Vol. 133, № 2. P. 189–204.
 144. Baraldi P.G. et al. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channel as emerging target for novel analgesics and anti-inflammatory agents // *J Med Chem.* 2010. Vol. 53, № 14. P. 5085–5107.
 145. Holzer P. Transient receptor potential (TRP) channels as drug targets for diseases of the digestive system // *Pharmacol Ther.* 2011. Vol. 131, № 1. P. 142–170.
 146. Nilius B., Appendino G., Owsianik G. The transient receptor potential channel TRPA1: from gene to pathophysiology // *Pflugers Arch.* 2012. Vol. 464, № 5. P.

- 425–458.
147. Andersson D.A. et al. TRPA1 mediates spinal antinociception induced by acetaminophen and the cannabinoid Delta(9)-tetrahydrocannabinol // *Nat Commun.* 2011. Vol. 2. P. 551.
 148. Hu H. et al. Activation of TRPA1 channels by fenamate nonsteroidal anti-inflammatory drugs // *Pflugers Arch.* 2010. Vol. 459, № 4. P. 579–592.
 149. Peyrot des Gachons C. et al. Unusual pungency from extra-virgin olive oil is attributable to restricted spatial expression of the receptor of oleocanthal // *J Neurosci.* 2011. Vol. 31, № 3. P. 999–1009.
 150. Cvetkov T.L. et al. Molecular architecture and subunit organization of TRPA1 ion channel revealed by electron microscopy // *J Biol Chem.* 2011. Vol. 286, № 44. P. 38168–38176.
 151. Cavanaugh E.J., Simkin D., Kim D. Activation of transient receptor potential A1 channels by mustard oil, tetrahydrocannabinol and Ca²⁺ reveals different functional channel states // *Neuroscience.* 2008. Vol. 154, № 4. P. 1467–1476.
 152. Xiao B. et al. Identification of transmembrane domain 5 as a critical molecular determinant of menthol sensitivity in mammalian TRPA1 channels // *J Neurosci.* 2008. Vol. 28, № 39. P. 9640–9651.
 153. Talavera K. et al. Nicotine activates the chemosensory cation channel TRPA1 // *Nat Neurosci.* 2009. Vol. 12, № 10. P. 1293–1299.
 154. Karashima Y. et al. Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1 // *J Neurosci.* 2007. Vol. 27, № 37. P. 9874–9884.
 155. Alpizar Y.A. et al. Bimodal effects of cinnamaldehyde and camphor on mouse TRPA1 // *Pflugers Arch.* 2013. Vol. 465, № 6. P. 853–864.
 156. Kichko T.I. et al. Bimodal concentration-response of nicotine involves the nicotinic acetylcholine receptor, transient receptor potential vanilloid type 1, and transient receptor potential ankyrin 1 channels in mouse trachea and sensory neurons // *J Pharmacol Exp Ther.* 2013. Vol. 347, № 2. P. 529–539.
 157. Takaishi M. et al. Inhibitory effects of monoterpenes on human TRPA1 and the structural basis of their activity // *J Physiol Sci.* 2014. Vol. 64, № 1. P. 47–57.
 158. Park C.K. et al. Resolvin D2 is a potent endogenous inhibitor for transient receptor potential subtype V1/A1, inflammatory pain, and spinal cord synaptic plasticity in

- mice: distinct roles of resolvin D1, D2, and E1 // *J Neurosci*. 2011. Vol. 31, № 50. P. 18433–18438.
159. Bang S. et al. Isopentenyl pyrophosphate is a novel antinociceptive substance that inhibits TRPV3 and TRPA1 ion channels // *Pain*. 2011. Vol. 152, № 5. P. 1156–1164.
160. Bang S. et al. Endogenous lipid-derived ligands for sensory TRP ion channels and their pain modulation // *Arch Pharm Res*. 2010. Vol. 33, № 10. P. 1509–1520.
161. del Camino D. et al. TRPA1 contributes to cold hypersensitivity // *J Neurosci*. 2010. Vol. 30, № 45. P. 15165–15174.
162. Karashima Y. et al. TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009. Vol. 106, № 4. P. 1273–1278.
163. Sawada Y. et al. Cold sensitivity of recombinant TRPA1 channels // *Brain Res*. 2007. Vol. 1160. P. 39–46.
164. Knowlton W.M. et al. TRPM8, but not TRPA1, is required for neural and behavioral responses to acute noxious cold temperatures and cold-mimetics in vivo // *Pain*. 2010. Vol. 150, № 2. P. 340–350.
165. Kwan K.Y. et al. TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction // *Neuron*. 2006. Vol. 50, № 2. P. 277–289.
166. Hoffmann T. et al. TRPA1 and TRPV1 are differentially involved in heat nociception of mice // *Eur J Pain*. 2013. Vol. 17, № 10. P. 1472–1482.
167. Chen J. et al. Selective blockade of TRPA1 channel attenuates pathological pain without altering noxious cold sensation or body temperature regulation // *Pain*. 2011. Vol. 152, № 5. P. 1165–1172.
168. Materazzi S. et al. TRPA1 and TRPV4 mediate paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice via a glutathione-sensitive mechanism // *Pflugers Arch*. 2012. Vol. 463, № 4. P. 561–569.
169. Chen Y., Yang C., Wang Z.J. Proteinase-activated receptor 2 sensitizes transient receptor potential vanilloid 1, transient receptor potential vanilloid 4, and transient receptor potential ankyrin 1 in paclitaxel-induced neuropathic pain // *Neuroscience*. 2011. Vol. 193. P. 440–451.
170. Chen J. et al. Species differences and molecular determinant of TRPA1 cold

- sensitivity // *Nat Commun.* 2013. Vol. 4. P. 2501.
171. Fajardo O. et al. TRPA1 channels mediate cold temperature sensing in mammalian vagal sensory neurons: pharmacological and genetic evidence // *J Neurosci.* 2008. Vol. 28, № 31. P. 7863–7875.
 172. Kremeyer B. et al. A gain-of-function mutation in TRPA1 causes familial episodic pain syndrome // *Neuron.* 2010. Vol. 66, № 5. P. 671–680.
 173. Binder A. et al. Transient receptor potential channel polymorphisms are associated with the somatosensory function in neuropathic pain patients // *PLoS One.* 2011. Vol. 6, № 3. P. e17387.
 174. May D. et al. Differential expression and functionality of TRPA1 protein genetic variants in conditions of thermal stimulation // *J Biol Chem.* 2012. Vol. 287, № 32. P. 27087–27094.
 175. Arenas O.M. et al. Activation of planarian TRPA1 by reactive oxygen species reveals a conserved mechanism for animal nociception // *Nat. Neurosci.* 2017. Vol. 20, № 12. P. 1686–1693.
 176. Viswanath V. et al. Opposite thermosensor in fruitfly and mouse // *Nature.* 2003. Vol. 423, № 6942. P. 822–823.
 177. Moparthi L. et al. Human TRPA1 is a heat sensor displaying intrinsic U-shaped thermosensitivity // *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6.
 178. Howard J., Bechstet S. Hypothesis: a helix of ankyrin repeats of the NOMPC-TRP ion channel is the gating spring of mechanoreceptors // *Curr Biol.* 2004. Vol. 14, № 6. P. R224-6.
 179. Walker R.G., Willingham A.T., Zuker C.S. A *Drosophila* mechanosensory transduction channel // *Science* (80-.). 2000. Vol. 287, № 5461. P. 2229–2234.
 180. Kerstein P.C. et al. Pharmacological blockade of TRPA1 inhibits mechanical firing in nociceptors // *Mol Pain.* 2009. Vol. 5. P. 19.
 181. Kwan K.Y. et al. TRPA1 modulates mechanotransduction in cutaneous sensory neurons // *J Neurosci.* 2009. Vol. 29, № 15. P. 4808–4819.
 182. Brierley S.M. et al. The ion channel TRPA1 is required for normal mechanosensation and is modulated by algescic stimuli // *Gastroenterology.* 2009. Vol. 137, № 6. P. 2084–2095 e3.
 183. Lennertz R.C. et al. TRPA1 mediates mechanical sensitization in nociceptors

- during inflammation // PLoS One. 2012. Vol. 7, № 8. P. e43597.
184. McGaraughty S. et al. TRPA1 modulation of spontaneous and mechanically evoked firing of spinal neurons in uninjured, osteoarthritic, and inflamed rats // Mol Pain. 2010. Vol. 6. P. 14.
 185. Vilceanu D., Stucky C.L. TRPA1 mediates mechanical currents in the plasma membrane of mouse sensory neurons // PLoS One. 2010. Vol. 5, № 8. P. e12177.
 186. Hill K., Schaefer M. TRPA1 is differentially modulated by the amphipathic molecules trinitrophenol and chlorpromazine // J Biol Chem. 2007. Vol. 282, № 10. P. 7145–7153.
 187. Zhang X.F. et al. Transient receptor potential A1 mediates an osmotically activated ion channel // Eur J Neurosci. 2008. Vol. 27, № 3. P. 605–611.
 188. Meseguer V. et al. TRPA1 channels mediate acute neurogenic inflammation and pain produced by bacterial endotoxins // Nat Commun. 2014. Vol. 5. P. 3125.
 189. Garrison S.R., Stucky C.L. Contribution of transient receptor potential ankyrin 1 to chronic pain in aged mice with complete Freund's adjuvant-induced arthritis // Arthritis Rheumatol. 2014. Vol. 66, № 9. P. 2380–2390.
 190. Minett M.S., Eijkelkamp N., Wood J.N. Significant determinants of mouse pain behaviour // PLoS One. 2014. Vol. 9, № 8. P. e104458.
 191. Petrus M. et al. A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition // Mol Pain. 2007. Vol. 3. P. 40.
 192. Nassenstein C. et al. Expression and function of the ion channel TRPA1 in vagal afferent nerves innervating mouse lungs // J Physiol. 2008. Vol. 586, № 6. P. 1595–1604.
 193. Coleridge J.C., Coleridge H.M. Afferent vagal C fibre innervation of the lungs and airways and its functional significance // Rev Physiol Biochem Pharmacol. 1984. Vol. 99. P. 1–110.
 194. Riccio M.M., Myers A.C., Udem B.J. Immunomodulation of afferent neurons in guinea-pig isolated airway // J Physiol. 1996. Vol. 491 (Pt 2. P. 499–509.
 195. Udem B.J. et al. Subtypes of vagal afferent C-fibres in guinea-pig lungs // J Physiol. 2004. Vol. 556, № Pt 3. P. 905–917.
 196. Udem B.J., McAlexander M., Hunter D.D. Neurobiology of the upper and lower airways // Allergy. 1999. Vol. 54 Suppl 5. P. 81–93.

197. Richardson J.D., Vasko M.R. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation // *J Pharmacol Exp Ther.* 2002. Vol. 302, № 3. P. 839–845.
198. Caceres A.I. et al. A sensory neuronal ion channel essential for airway inflammation and hyperreactivity in asthma // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009. Vol. 106, № 22. P. 9099–9104.
199. Sekirov I. et al. Gut microbiota in health and disease // *Physiol Rev.* 2010. Vol. 90, № 3. P. 859–904.
200. Xavier R.J., Podolsky D.K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease // *Nature.* 2007. Vol. 448, № 7152. P. 427–434.
201. Johansson M. et al. New aspects concerning ulcerative colitis and colonic carcinoma: analysis of levels of neuropeptides, neurotrophins, and TNFalpha/TNF receptor in plasma and mucosa in parallel with histological evaluation of the intestine // *Inflamm Bowel Dis.* 2008. Vol. 14, № 10. P. 1331–1340.
202. Tavano F. et al. Neuroimmune interactions in patients with inflammatory bowel diseases: disease activity and clinical behavior based on Substance P serum levels // *J Crohns Colitis.* 2012. Vol. 6, № 5. P. 563–570.
203. Podolsky D.K. Inflammatory bowel disease // *N Engl J Med.* 2002. Vol. 347, № 6. P. 417–429.
204. Kaji I. et al. Activation of TRPA1 by luminal stimuli induces EP4-mediated anion secretion in human and rat colon // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012. Vol. 302, № 7. P. G690-701.
205. Penuelas A. et al. Contractile effect of TRPA1 receptor agonists in the isolated mouse intestine // *Eur J Pharmacol.* 2007. Vol. 576, № 1–3. P. 143–150.
206. Christianson J.A. et al. Neonatal colon insult alters growth factor expression and TRPA1 responses in adult mice // *Pain.* 2010. Vol. 151, № 2. P. 540–549.
207. Kondo T. et al. Transient receptor potential A1 mediates gastric distention-induced visceral pain in rats // *Gut.* 2009. Vol. 58, № 10. P. 1342–1352.
208. Malin S. et al. TRPV1 and TRPA1 function and modulation are target tissue dependent // *J Neurosci.* 2011. Vol. 31, № 29. P. 10516–10528.
209. Ceppa E. et al. Transient receptor potential ion channels V4 and A1 contribute to pancreatitis pain in mice // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010. Vol. 299, № 3. P. G556-71.

210. Schwartz E.S. et al. Synergistic role of TRPV1 and TRPA1 in pancreatic pain and inflammation // *Gastroenterology*. 2011. Vol. 140, № 4. P. 1282–1283.
211. Schwartz E.S. et al. TRPV1 and TRPA1 antagonists prevent the transition of acute to chronic inflammation and pain in chronic pancreatitis // *J Neurosci*. 2013. Vol. 33, № 13. P. 5603–5611.
212. Horvath A. et al. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor is involved in chronic arthritis: in vivo study using TRPA1-deficient mice // *Arthritis Res Ther*. 2016. Vol. 18, № 1. P. 6.
213. Schmelz M. et al. Specific C-receptors for itch in human skin // *J Neurosci*. 1997. Vol. 17, № 20. P. 8003–8008.
214. Ross S.E. Pain and itch: insights into the neural circuits of aversive somatosensation in health and disease // *Curr Opin Neurobiol*. 2011. Vol. 21, № 6. P. 880–887.
215. Namer B. et al. Separate peripheral pathways for pruritus in man // *J Neurophysiol*. 2008. Vol. 100, № 4. P. 2062–2069.
216. Roberson D.P. et al. Activity-dependent silencing reveals functionally distinct itch-generating sensory neurons // *Nat Neurosci*. 2013. Vol. 16, № 7. P. 910–918.
217. Fernandes E.S. et al. Superoxide generation and leukocyte accumulation: key elements in the mediation of leukotriene B(4)-induced itch by transient receptor potential ankyrin 1 and transient receptor potential vanilloid 1 // *FASEB J*. 2013. Vol. 27, № 4. P. 1664–1673.
218. Liu T., Ji R.R. Oxidative stress induces itch via activation of transient receptor potential subtype ankyrin 1 in mice // *Neurosci Bull*. 2012. Vol. 28, № 2. P. 145–154.
219. Meotti F.C. et al. Antagonism of the transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) attenuates hyperalgesia and urinary bladder overactivity in cyclophosphamide-induced haemorrhagic cystitis // *Chem Biol Interact*. 2013. Vol. 203, № 2. P. 440–447.
220. Andrade E.L. et al. TRPA1 receptor modulation attenuates bladder overactivity induced by spinal cord injury // *Am J Physiol Ren. Physiol*. 2011. Vol. 300, № 5. P. F1223-34.
221. Andersson K.E., Gratzke C., Hedlund P. The role of the transient receptor potential

- (TRP) superfamily of cation-selective channels in the management of the overactive bladder // *BJU Int.* 2010. Vol. 106, № 8. P. 1114–1127.
222. Birder L.A. Nervous network for lower urinary tract function // *Int J Urol.* 2013. Vol. 20, № 1. P. 4–12.
223. Kanai A.J. Afferent mechanism in the urinary tract // *Handb Exp Pharmacol.* 2011. № 202. P. 171–205.
224. Moran M.M. et al. Transient receptor potential channels as therapeutic targets // *Nat Rev Drug Discov.* 2011. Vol. 10, № 8. P. 601–620.
225. Wei H. et al. Roles of cutaneous versus spinal TRPA1 channels in mechanical hypersensitivity in the diabetic or mustard oil-treated non-diabetic rat // *Neuropharmacology.* 2010. Vol. 58, № 3. P. 578–584.
226. Wei H. et al. Attenuation of mechanical hypersensitivity by an antagonist of the TRPA1 ion channel in diabetic animals // *Anesthesiology.* 2009. Vol. 111, № 1. P. 147–154.
227. Koivisto A. et al. Inhibiting TRPA1 ion channel reduces loss of cutaneous nerve fiber function in diabetic animals: sustained activation of the TRPA1 channel contributes to the pathogenesis of peripheral diabetic neuropathy // *Pharmacol Res.* 2012. Vol. 65, № 1. P. 149–158.
228. Trevisan G. et al. Novel therapeutic strategy to prevent chemotherapy-induced persistent sensory neuropathy by TRPA1 blockade // *Cancer Res.* 2013. Vol. 73, № 10. P. 3120–3131.
229. Stokes A. et al. TRPA1 is a substrate for de-ubiquitination by the tumor suppressor CYLD // *Cell Signal.* 2006. Vol. 18, № 10. P. 1584–1594.
230. Vennekens R., Menigoz A., Nilius B. TRPs in the Brain // *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2012. Vol. 163. P. 27–64.
231. Kim Y.S. et al. Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in the rat trigeminal sensory afferents and spinal dorsal horn // *J Comp Neurol.* 2010. Vol. 518, № 5. P. 687–698.
232. Yokoyama T. et al. Allyl isothiocyanates and cinnamaldehyde potentiate miniature excitatory postsynaptic inputs in the supraoptic nucleus in rats // *Eur J Pharmacol.* 2011. Vol. 655, № 1–3. P. 31–37.
233. Koch M. et al. The cannabinoid WIN 55,212-2-mediated protection of dentate

- gyrus granule cells is driven by CB1 receptors and modulated by TRPA1 and Cav 2.2 channels // *Hippocampus*. 2011. Vol. 21, № 5. P. 554–564.
234. Lee S.M. et al. An ultrastructural evidence for the expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in astrocytes in the rat trigeminal caudal nucleus // *J Chem Neuroanat*. 2012. Vol. 45, № 1–2. P. 45–49.
235. Shigetomi E. et al. TRPA1 channels are regulators of astrocyte basal calcium levels and long-term potentiation via constitutive D-serine release // *J Neurosci*. 2013. Vol. 33, № 24. P. 10143–10153.
236. Shigetomi E. et al. TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3 // *Nat Neurosci*. 2012. Vol. 15, № 1. P. 70–80.
237. Due M.R. et al. Acrolein involvement in sensory and behavioral hypersensitivity following spinal cord injury in the rat // *J Neurochem*. 2014. Vol. 128, № 5. P. 776–786.
238. Gregus A.M. et al. Spinal 12-lipoxygenase-derived hepxilin A3 contributes to inflammatory hyperalgesia via activation of TRPV1 and TRPA1 receptors // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012. Vol. 109, № 17. P. 6721–6726.
239. Lee I. et al. The role of reactive oxygen species in capsaicin-induced mechanical hyperalgesia and in the activities of dorsal horn neurons // *Pain*. 2007. Vol. 133, № 1–3. P. 9–17.
240. Sisignano M. et al. 5,6-EET is released upon neuronal activity and induces mechanical pain hypersensitivity via TRPA1 on central afferent terminals // *J Neurosci*. 2012. Vol. 32, № 18. P. 6364–6372.
241. Cho J.H. et al. TRPA1-like channels enhance glycinergic transmission in medullary dorsal horn neurons // *J Neurochem*. 2012. Vol. 122, № 4. P. 691–701.
242. Kosugi M. et al. Activation of TRPA1 channel facilitates excitatory synaptic transmission in substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord // *J Neurosci*. 2007. Vol. 27, № 16. P. 4443–4451.
243. Uta D. et al. TRPA1-expressing primary afferents synapse with a morphologically identified subclass of substantia gelatinosa neurons in the adult rat spinal cord // *Eur J Neurosci*. 2010. Vol. 31, № 11. P. 1960–1973.
244. Wrigley P.J., Jeong H.J., Vaughan C.W. Primary afferents with TRPM8 and

- TRPA1 profiles target distinct subpopulations of rat superficial dorsal horn neurones // *Br J Pharmacol*. 2009. Vol. 157, № 3. P. 371–380.
245. Raisinghani M. et al. Activation characteristics of transient receptor potential ankyrin 1 and its role in nociception // *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011. Vol. 301, № 3. P. C587-600.
246. Wei H. et al. Spinal transient receptor potential ankyrin 1 channel induces mechanical hypersensitivity, increases cutaneous blood flow, and mediates the pronociceptive action of dynorphin A // *J Physiol Pharmacol*. 2013. Vol. 64, № 3. P. 331–340.
247. da Costa D.S. et al. The involvement of the transient receptor potential A1 (TRPA1) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation // *Pain*. 2010. Vol. 148, № 3. P. 431–437.
248. Fernandes E.S. et al. A distinct role for transient receptor potential ankyrin 1, in addition to transient receptor potential vanilloid 1, in tumor necrosis factor alpha-induced inflammatory hyperalgesia and Freund's complete adjuvant-induced monoarthritis // *Arthritis Rheum*. 2011. Vol. 63, № 3. P. 819–829.
249. Wei H., Koivisto A., Pertovaara A. Spinal TRPA1 ion channels contribute to cutaneous neurogenic inflammation in the rat // *Neurosci Lett*. 2010. Vol. 479, № 3. P. 253–256.
250. Wei H. et al. Spinal transient receptor potential ankyrin 1 channel contributes to central pain hypersensitivity in various pathophysiological conditions in the rat // *Pain*. 2011. Vol. 152, № 3. P. 582–591.
251. Xing J., Lu J., Li J. TRPA1 mediates amplified sympathetic responsiveness to activation of metabolically sensitive muscle afferents in rats with femoral artery occlusion // *Front Physiol*. 2015. Vol. 6. P. 249.
252. Sasaki A. et al. A mouse model of peripheral postischemic dysesthesia: involvement of reperfusion-induced oxidative stress and TRPA1 channel // *J Pharmacol Exp Ther*. 2014. Vol. 351, № 3. P. 568–575.
253. Gough N.R. Toxic TRPA1 activity degrades myelin // *Sci Signal*. 2016. Vol. 351, № 6274. P. 641–782.
254. Izzo A.A. et al. Inhibitory effect of cannabichromene, a major non-psychoactive cannabinoid extracted from *Cannabis sativa*, on inflammation-induced

- hypermotility in mice // *Br J Pharmacol*. 2012. Vol. 166, № 4. P. 1444–1460.
255. Schaefer E.A. et al. Stimulation of the chemosensory TRPA1 cation channel by volatile toxic substances promotes cell survival of small cell lung cancer cells // *Biochem Pharmacol*. 2013. Vol. 85, № 3. P. 426–438.
256. Edelmayer R.M. et al. Activation of TRPA1 on dural afferents: a potential mechanism of headache pain // *Pain*. 2012. Vol. 153, № 9. P. 1949–1958.
257. Nassini R. et al. The “headache tree” via umbellulone and TRPA1 activates the trigeminovascular system // *Brain*. 2012. Vol. 135, № Pt 2. P. 376–390.
258. Klionsky L. et al. Species-specific pharmacology of Trichloro(sulfanyl)ethyl benzamides as transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) antagonists // *Mol Pain*. 2007. Vol. 3. P. 39.
259. Chen J., Kym P.R. TRPA1: the species difference // *J Gen Physiol*. 2009. Vol. 133, № 6. P. 623–625.
260. Fischer M.J. et al. The general anesthetic propofol excites nociceptors by activating TRPV1 and TRPA1 rather than GABAA receptors // *J Biol Chem*. 2010. Vol. 285, № 45. P. 34781–34792.
261. Nagatomo K., Kubo Y. Caffeine activates mouse TRPA1 channels but suppresses human TRPA1 channels // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008. Vol. 105, № 45. P. 17373–17378.
262. Nagatomo K. et al. The Met268Pro mutation of mouse TRPA1 changes the effect of caffeine from activation to suppression // *Biophys J*. 2010. Vol. 99, № 11. P. 3609–3618.
263. Sadofsky L.R. et al. TRPA1 is activated by direct addition of cysteine residues to the N-hydroxysuccinyl esters of acrylic and cinnamic acids // *Pharmacol Res*. 2011. Vol. 63, № 1. P. 30–36.
264. Babes A. et al. The anti-diabetic drug glibenclamide is an agonist of the transient receptor potential Ankyrin 1 (TRPA1) ion channel // *Eur J Pharmacol*. 2013. Vol. 704, № 1–3. P. 15–22.
265. Leffler A. et al. Activation of TRPA1 by membrane permeable local anesthetics // *Mol Pain*. 2011. Vol. 7. P. 62.
266. Hu H. et al. Zinc activates damage-sensing TRPA1 ion channels // *Nat Chem Biol*. 2009. Vol. 5, № 3. P. 183–190.

267. Escalera J. et al. TRPA1 mediates the noxious effects of natural sesquiterpene deterrents // *J Biol Chem*. 2008. Vol. 283, № 35. P. 24136–24144.
268. Riera C.E. et al. Compounds from Sichuan and Melegueta peppers activate, covalently and non-covalently, TRPA1 and TRPV1 channels // *Br J Pharmacol*. 2009. Vol. 157, № 8. P. 1398–1409.
269. Matta J.A. et al. General anesthetics activate a nociceptive ion channel to enhance pain and inflammation // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008. Vol. 105, № 25. P. 8784–8789.
270. Maher M. et al. Activation of TRPA1 by farnesyl thiosalicylic acid // *Mol Pharmacol*. 2008. Vol. 73, № 4. P. 1225–1234.
271. Liu K. et al. NPPB structure-specifically activates TRPA1 channels // *Biochem Pharmacol*. 2010. Vol. 80, № 1. P. 113–121.
272. Nassini R. et al. Oxaliplatin elicits mechanical and cold allodynia in rodents via TRPA1 receptor stimulation // *Pain*. 2011. Vol. 152, № 7. P. 1621–1631.
273. Shintaku K. et al. Activation of transient receptor potential A1 by a non-pungent capsaicin-like compound, capsiate // *Br J Pharmacol*. 2012. Vol. 165, № 5. P. 1476–1486.
274. Takaishi M. et al. 1,8-cineole, a TRPM8 agonist, is a novel natural antagonist of human TRPA1 // *Mol Pain*. 2012. Vol. 8. P. 86.
275. Wang S. et al. Cardamonin, a novel antagonist of hTRPA1 cation channel, reveals therapeutic mechanism of pathological pain // *Molecules*. 2016. Vol. 21, № 9.
276. McNamara C.R. et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007. Vol. 104, № 33. P. 13525–13530.
277. Moran M.M. et al. Trpa1 inhibitors for treating pain. Google Patents, 2007.
278. Eid S.R. et al. HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity // *Mol Pain*. 2008. Vol. 4. P. 48.
279. Li Q. et al. Inhibiting the transient receptor potential a1 ion channel. Google Patents, 2014.
280. Metcalf C.A. et al. Inhibiting transient receptor potential ion channel trpa1. Google Patents, 2013.
281. W.M. A. Animal models of asthma // *Asthma and Rhinitis* / ed. Busse W.W.

- H.S.T. Oxford, UK: Blackwell Science, 2000. 1205–1227 p.
282. Schenkel L.B. et al. Optimization of a Novel Quinazolinone-Based Series of Transient Receptor Potential A1 (TRPA1) Antagonists Demonstrating Potent in Vivo Activity // *J. Med. Chem.* 2016. Vol. 59, № 6. P. 2794–2809.
 283. Gijzen H.J.M. et al. Tricyclic 3,4-dihydropyrimidine-2-thione derivatives as potent TRPA1 antagonists // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012. Vol. 22, № 2. P. 797–800.
 284. Bhattacharya A. et al. The effect of a novel TRPA1 antagonist JNJ-41477670 on models of airway hyperactivity and inflammation in rats // *Faseb J.* 2014. Vol. 28, № 1.
 285. Brotherton-Pleiss C.E. et al. Composés substitués du phénylcarbamate. Google Patents, 2014.
 286. Defalco J. et al. Oxime derivatives related to AP18: Agonists and antagonists of the TRPA1 receptor // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010. Vol. 20, № 1. P. 276–279.
 287. Nyman E. et al. In vitro pharmacological characterization of a novel TRPA1 antagonist and proof of mechanism in a human dental pulp model // *J Pain Res.* 2013. Vol. 6. P. 59–70.
 288. Svensson M., Weigelt D. Trpa1 receptor antagonist. Google Patents, 2012.
 289. Vallin K.S.A. et al. N-1-Alkyl-2-oxo-2-aryl amides as novel antagonists of the TRPA1 receptor // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012. Vol. 22, № 17. P. 5485–5492.
 290. Laliberte S. et al. Discovery of a series of aryl-N-(3-(alkylamino)-5-(trifluoromethyl)phenyl)benzamides as TRPA1 antagonists // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2014. Vol. 24, № 14. P. 3204–3206.
 291. Fruttarolo F. et al. Novel sulfonamide trpa1 receptor antagonists. Google Patents, 2014.
 292. Rooney L. et al. Discovery, Optimization, and Biological Evaluation of 5-(2-(Trifluoromethyl)phenyl)indazoles as a Novel Class of Transient Receptor Potential A1 (TRPA1) Antagonists // *J Med Chem.* 2014. Vol. 57, № 12. P. 5129–5140.
 293. Pryde D.C. et al. The discovery of a potent series of carboxamide TRPA1 antagonists // *Med. Chem. Commun.* 2016. Vol. 7, № 11. P. 2145–2158.
 294. Kanju P. et al. Small molecule dual-inhibitors of TRPV4 and TRPA1 for attenuation of inflammation and pain // *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6.

295. Tonello R. et al. The peptide Ph α 1 β , from spider venom, acts as a TRPA1 channel antagonist with antinociceptive effects in mice // *Br. J. Pharmacol.* 2017. Vol. 174, № 1. P. 57–69.
296. de Souza A.H. et al. Antiallodynic effect and side effects of Ph α 1 β , a neurotoxin from the spider *Phoneutria nigriventer*: Comparison with ω -conotoxin MVIIA and morphine // *Toxicon.* 2011. Vol. 58, № 8. P. 626–633.
297. Weng H.J. et al. Tmem100 Is a Regulator of TRPA1-TRPV1 Complex and Contributes to Persistent Pain // *Neuron.* 2015. Vol. 85, № 4. P. 833–846.
298. Preti D., Szallasi A., Patacchini R. TRP channels as therapeutic targets in airway disorders: a patent review // *Expert Opin. Ther. Pat.* 2012. Vol. 22, № 6. P. 663–695.
299. EvaluatePharma. No Title [Electronic resource]. www.evaluatepharma.com.
300. Anupindi I.; Thomas, A. R.. M. GRC 17536, a novel, selective TRPA1 antagonist for potential treatment of respiratory disorders // European Respiratory Society, AnnualCongress. Barcelona, Spain 18-22 September, 2010.
301. ClinicalTrials.gov. A Clinical Trial to Study the Effects GRC 17536 in Patients With Painful Diabetic Peripheral Neuropathy (Painful Extremities Due to Peripheral Nerve Damage in Diabetic Patients). [Electronic resource]. <https://clinicaltrials.gov>, 2014.
302. AdisInsight. GRC 17536 [Electronic resource]. <http://adisinsight.springer.com>.
303. Andreev Y.A. et al. Cyanogen bromide cleavage of proteins in salt and buffer solutions // *Anal Biochem.* Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, 117997 Moscow, Russia. ay@land.ru, 2010. Vol. 407, № 1. P. 144–146.
304. Wuthrich K. *NMR of Proteins and Nucleic acids* // John Wiley Sons, New York. 1986.
305. Herrmann T., Guntert P., Wuthrich K. Protein NMR structure determination with automated NOE assignment using the new software CANDID and the torsion angle dynamics algorithm DYANA // *J. Mol. Biol.* ETH Zurich, Inst Mol Biol & Biophys, CH-8093 Zurich, Switzerland, 2002. Vol. 319, № 1. P. 209–227.
306. Delaglio F., Wu Z., Bax A. Measurement of homonuclear proton couplings from regular 2D COSY spectra // *J Magn Reson.* Laboratory of Chemical Physics,

- National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892, USA., 2001. Vol. 149, № 2. P. 276–281.
307. Koradi R., Billeter M., Wuthrich K. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures // *J Mol Graph*. Institut fur Molekularbiologie und Biophysik, Eidgenossische Technische Hochschule-Honggerberg, Zurich, Switzerland., 1996. Vol. 14, № 1. P. 29-32-55.
308. Laskowski R.A. et al. PDBsum: a Web-based database of summaries and analyses of all PDB structures // *Trends Biochem Sci*. Department of Crystallography, Birkbeck College, University of London, UK. roman@biochem.ucl.ac.uk, 1997. Vol. 22, № 12. P. 488–490.
309. Krissinel E., Henrick K. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. European Bioinformatics Institute, Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, England. keb@ebi.ac.uk, 2004. Vol. 60, № Pt 12 Pt 1. P. 2256–2268.
310. Altschul S.F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // *Nucleic Acids Res*. National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20894, USA. altschul@ncbi.nlm.nih.gov, 1997. Vol. 25, № 17. P. 3389–3402.
311. Kozlov S., Grishin E. The mining of toxin-like polypeptides from EST database by single residue distribution analysis // *BMC Genomics*. Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, 117997 Moscow, Russia., 2011. Vol. 12. P. 88.
312. Kozlov S., Grishin E. Classification of spider neurotoxins using structural motifs by primary structure features. Single residue distribution analysis and pattern analysis techniques // *Toxicon*. Neuroreceptors and Neuroregulators Department, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, 117997 Moscow, Russian Federation. serg@ibch.ru, 2005. Vol. 46, № 6. P. 672–686.
313. Wang G. Improved methods for classification, prediction, and design of antimicrobial peptides // *Methods Mol Biol*. Department of Pathology and

- Microbiology, University of Nebraska Medical Center, 986495 Nebraska Medical Center, Omaha, NE, 68198-6495, USA, gwang@unmc.edu., 2015. Vol. 1268. P. 43–66.
314. Jones P. et al. InterProScan 5: genome-scale protein function classification // *Bioinformatics*. 2014. Vol. 30, № 9. P. 1236–1240.
315. Sullivan J.C. et al. StellaBase: The *Nematostella vectensis* Genomics Database // *Nucleic Acids Res.* 2006. Vol. 34, № suppl 1. P. D495–D499.
316. Bairoch A. et al. The Universal Protein Resource (UniProt) // *Nucleic Acids Res.* 2005. Vol. 33, № DATABASE ISS.
317. Petersen T.N. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions // *Nat Methods*. 2011. Vol. 8, № 10. P. 785–786.
318. Patiny L., Borel A. ChemCalc: a building block for tomorrow's chemical infrastructure // *J Chem Inf Model*. Ecole Polytechnique Federale de Lausanne, Lausanne, Switzerland. luc.patiny@epfl.ch, 2013. Vol. 53, № 5. P. 1223–1228.
319. Solstad R.G. et al. Novel Antimicrobial Peptides EeCentrocins 1, 2 and EeStrongylocin 2 from the Edible Sea Urchin *Echinus esculentus* Have 6-Br-Trp Post-Translational Modifications // *PLoS One*. The Norwegian College of Fishery Science, Faculty of Biosciences, Fisheries and Economics, UiT The Arctic University of Norway, Tromso, Norway. Department of Chemistry, the Faculty of Science and Technology, UiT The Arctic University of Norway, Tromso, No, 2016. Vol. 11, № 3. P. e0151820.
320. Shelukhina I. et al. Functional expression and axonal transport of α 7 nAChRs by peptidergic nociceptors of rat dorsal root ganglion // *Brain Struct. Funct.* 2014. Vol. 220, № 4. P. 1885–1899.
321. Jouiaei M. et al. Ancient Venom Systems: A Review on Cnidaria Toxins // *Toxins* (Basel). Venom Evolution Lab, School of Biological Sciences, the University of Queensland, St. Lucia 4072, QLD, Australia. m.jouiaei@uq.edu.au. Institute for Molecular Bioscience, the University of Queensland, St. Lucia 4072, QLD, Australia. m.jouiaei@uq.edu.au. P, 2015. Vol. 7, № 6. P. 2251–2271.
322. Mikov A.N., Kozlov S.A. Structural features of cysteine-rich polypeptides from sea anemone venoms // *Russ. J. Bioorganic Chem.* 2015. Vol. 41, № 5. P. 455–466.
323. Cassoli J.S. et al. The proteomic profile of *Stichodactyla duerdeni* secretion reveals

- the presence of a novel O-linked glycopeptide // *J Proteomics*. Laboratorio de Venenos e Toxinas Animais, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil. jscassoli@ufmg.br, 2013. Vol. 87. P. 89–102.
324. Zaharenko A.J. et al. Proteomics of the neurotoxic fraction from the sea anemone *Bunodosoma cangicum* venom: Novel peptides belonging to new classes of toxins // *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*. Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matao, Travessa 14, 321, CEP 05508-900 São Paulo-SP, Brazil., 2008. Vol. 3, № 3. P. 219–225.
325. Honma T. et al. Novel peptide toxins from the sea anemone *Stichodactyla haddoni* // *Peptides*. Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology, Konan-4, Tokyo 108-8477, Japan., 2008. Vol. 29, № 4. P. 536–544.
326. Kozlov S., Grishin E. Convenient nomenclature of cysteine-rich polypeptide toxins from sea anemones // *Peptides*. Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul Miklukho-Maklaya 16/10, 117997 Moscow, Russia. serg@ibch.ru, 2012. Vol. 33, № 2. P. 240–244.
327. Kozlov S.A., Grishin E. V. The universal algorithm of maturation for secretory and excretory protein precursors // *Toxicon*. Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, 117997 Moscow, Russia. serg@ibch.ru, 2007. Vol. 49, № 5. P. 721–726.
328. Osmakov D.I. et al. Sea anemone peptide with uncommon beta-hairpin structure inhibits acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) and reveals analgesic activity // *J Biol Chem*. Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, 117997 Moscow., 2013. Vol. 288, № 32. P. 23116–23127.
329. Utkina L.L. et al. Genes encoding 4-Cys antimicrobial peptides in wheat *Triticum kiharae* Dorof. et Migush.: multimodular structural organization, intraspecific variability, distribution and role in defence // *FEBS J*. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia. lyuba_utm@mail.ru, 2013. Vol. 280, № 15. P. 3594–3608.

330. Honma T. et al. Isolation and molecular cloning of novel peptide toxins from the sea anemone *Antheopsis maculata* // *Toxicon*. Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology, Konan-4, Minato-ku, Tokyo 108-8477, Japan., 2005. Vol. 45, № 1. P. 33–41.
331. Andreev Y.A. et al. Analgesic compound from sea anemone *Heteractis crispa* is the first polypeptide inhibitor of vanilloid receptor 1 (TRPV1) // *J Biol Chem*. Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow. ay@land.ru, 2008. Vol. 283, № 35. P. 23914–23921.
332. Pineda S.S. et al. Spider venomomics: implications for drug discovery // *Futur. Med Chem*. Institute for Molecular Bioscience, University of Queensland, Queensland, Australia., 2014. Vol. 6, № 15. P. 1699–1714.
333. Frazao B., Vasconcelos V., Antunes A. Sea anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) toxins: an overview // *Mar Drugs*. CIMAR/CIIMAR, Centro Interdisciplinar de Investigacao Marinha e Ambiental, Universidade do Porto, Rua dos Bragas 177, 4050-123 Porto, Portugal., 2012. Vol. 10, № 8. P. 1812–1851.
334. Jouiaei M. et al. Evolution of an ancient venom: recognition of a novel family of cnidarian toxins and the common evolutionary origin of sodium and potassium neurotoxins in sea anemone // *Mol Biol Evol*. Venom Evolution Laboratory, School of Biological Sciences, The University of Queensland, St. Lucia, Queensland, Australia Institute for Molecular Bioscience, The University of Queensland, St. Lucia, Queensland, Australia. Department of Ecology, Evolution , 2015. Vol. 32, № 6. P. 1598–1610.
335. Andreeva A. et al. Data growth and its impact on the SCOP database: new developments // *Nucleic Acids Res*. MRC Centre for Protein Engineering, Hills Road, Cambridge CB2 0QH, UK., 2008. Vol. 36, № Database issue. P. D419-25.
336. Pazgier M. et al. Human beta-defensins // *Cell. Mol. Life Sci*. NCI, Macromol Crystallog Lab, Frederick, MD 21702 USA NIH, Ctr Informat Technol, Sci Comp Branch, Bethesda, MD 20892 USA NCI, Lab Mol Immunoregulat, Canc Res Ctr, Basic Res Program, SAIC Frederick Inc, Ft Detrick, MD 21702 USA Univ Maryland, Inst Human Vir, 2006. Vol. 63, № 11. P. 1294–1313.
337. Pallaghy P.K. et al. 3-Dimensional Structure in Solution of the Polypeptide Cardiac

- Stimulant Anthopleurin-A // *Biochemistry. Biomolec Res Inst,Nmr Lab,Parkville,Vic 3052,Australia*, 1995. Vol. 34, № 11. P. 3782–3794.
338. Salceda E. et al. CgNa, a type I toxin from the giant Caribbean sea anemone *Condylactis gigantea* shows structural similarities to both type I and II toxins, as well as distinctive structural and functional properties(1) // *Biochem J. Instituto de Fisiologia, Universidad Autonoma de Puebla, 14 Sur 6301, 72570 Puebla, Mexico.*, 2007. Vol. 406, № 1. P. 67–76.
339. Norton R.S. Structure and Structure-Function-Relationships of Sea-Anemone Proteins That Interact with the Sodium-Channel // *Toxicon*. 1991. Vol. 29, № 9. P. 1051–1084.
340. LaVallie E.R. et al. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm // *Biotechnol. (N Y). Genetics Institute, Cambridge, MA 02140.*, 1993. Vol. 11, № 2. P. 187–193.
341. Schweitz H. et al. Kalicludines and kaliseptine. Two different classes of sea anemone toxins for voltage sensitive K⁺ channels // *J Biol Chem. Institut de Pharmacologie Moleculaire et Cellulaire, Valbonne, France.*, 1995. Vol. 270, № 42. P. 25121–25126.
342. Garcia-Fernandez R. et al. The Kunitz-Type Protein ShPI-1 Inhibits Serine Proteases and Voltage-Gated Potassium Channels // *Toxins (Basel). Centro de Estudio de Proteinas, Facultad de Biologia, Universidad de la Habana, Calle 25 No. 455, 10400 La Habana, Cuba. rossana.gf@gmail.com. Laboratory of Toxicology and Pharmacology, KU Leuven, Campus Gasthuisberg O&N2, Herestraat 49, P.O. Box 922, 2016. Vol. 8, № 4.*
343. Andreev Y.A. et al. Polypeptide modulators of TRPV1 produce analgesia without hyperthermia // *Mar Drugs. Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 16/10 Miklukho-Maklaya Str., Moscow 117997, Russia. serg@ibch.ru.*, 2013. Vol. 11, № 12. P. 5100–5115.
344. Trapani M.R. et al. First evidence of antimicrobial activity of neurotoxin 2 from *Anemonia sulcata* (Cnidaria) // *Isj-Invertebrate Surviv. J. Univ Palermo, Marine Immunobiol Lab, Dept Biol Chem Pharmaceut Sci & Technol, Palermo, Italy Univ Montpellier 2, CNRS, Ecol Syst Marins Cotiers, Montpellier, France Univ Rouen, CNRS, Plateforme Proteom PISSARO, Mont St Aignan, France*, 2014. Vol. 11. P.

- 182–191.
345. Yang W. et al. Endogenous animal toxin-like human beta-defensin 2 inhibits own K(+) channels through interaction with channel extracellular pore region // *Cell Mol Life Sci*. State Key Laboratory of Virology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan, 430072, China., 2015. Vol. 72, № 4. P. 845–853.
346. Liu C.Y. et al. The role of large-conductance, calcium-activated potassium channels in a rat model of trigeminal neuropathic pain // *Cephalalgia*. Department of Physiology and Key Laboratory of Molecular Neurobiology, Ministry of Education, Second Military Medical University, PR China Department of Stomatology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, PR China. Department of Physiolo, 2015. Vol. 35, № 1. P. 16–35.
347. Paulsen V.S. et al. Structure-Activity Relationships of the Antimicrobial Peptide Arasin 1 - And Mode of Action Studies of the N-Terminal, Proline-Rich Region // *PLoS One*. 2013. Vol. 8, № 1.
348. Lehrer R.I., Lu W. alpha-Defensins in human innate immunity // *Immunol Rev*. Department of Medicine and Molecular Biology Institute, David Geffen School of Medicine at UCLA, Los Angeles, CA 90095-1688, USA. rlehrer@mednet.ucla.edu, 2012. Vol. 245, № 1. P. 84–112.
349. Satchell D.P. et al. Quantitative interactions between cryptdin-4 amino terminal variants and membranes // *Peptides*. Department of Pathology, College of Medicine, University of California, Irvine, CA 92697-4800, USA., 2003. Vol. 24, № 11. P. 1795–1805.
350. Ruparel N.B. et al. Homologous and heterologous desensitization of capsaicin and mustard oil responses utilize different cellular pathways in nociceptors // *Pain*. 2008. Vol. 135, № 3. P. 271–279.
351. Nilius B., Flockerzi V. Mammalian transient receptor potential (TRP) cation channels. Preface // *Handb Exp Pharmacol*. 2014.
352. Bautista D.M., Pellegrino M., Tsunozaki M. TRPA1: A gatekeeper for inflammation // *Annu Rev Physiol*. Department of Molecular & Cell Biology, University of California, Berkeley, California 94720, USA. dbautista@berkeley.edu, 2013. Vol. 75. P. 181–200.
353. Caterina M.J. Chemical biology: sticky spices // *Nature*. 2007. Vol. 445, № 7127.

- P. 491–492.
354. Zhou Y. et al. Identification of a splice variant of mouse TRPA1 that regulates TRPA1 activity // Nat Commun. Division of Cell Signaling, Okazaki Institute for Integrative Bioscience (National Institute for Physiological Sciences), National Institutes of Natural Sciences, Okazaki, Japan., 2013. Vol. 4. P. 2399.
 355. Taylor-Clark T.E. et al. Prostaglandin-induced activation of nociceptive neurons via direct interaction with transient receptor potential A1 (TRPA1) // Mol Pharmacol. Johns Hopkins Medical Institutions, Johns Hopkins Asthma and Allergy Center, 3A.44, Baltimore, MD 21224, USA. bundem@jhmi.edu, 2008. Vol. 73, № 2. P. 274–281.
 356. Brierley S.M. et al. TRPA1 contributes to specific mechanically activated currents and sensory neuron mechanical hypersensitivity // J Physiol. Nerve-Gut Research Laboratory, Department of Gastroenterology and Hepatology, Hanson Institute, Royal Adelaide Hospital, Adelaide, South Australia, Australia 5000. stuart.brierley@adelaide.edu.au, 2011. Vol. 589, № Pt 14. P. 3575–3593.
 357. Preti D., Saponaro G., Szallasi A. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) antagonists // Pharm Pat Anal. Department of Chemical & Pharmaceutical Sciences, University of Ferrara, Italy., 2015. Vol. 4, № 2. P. 75–94.
 358. Brederson J.D., Kym P.R., Szallasi A. Targeting TRP channels for pain relief // Eur J Pharmacol. Neuroscience Discovery Research and Pain Discovery Research, AbbVie Inc, North Chicago, IL 60064, USA., 2013. Vol. 716, № 1–3. P. 61–76.
 359. Kojima R. et al. Effects of novel TRPA1 receptor agonist ASP7663 in models of drug-induced constipation and visceral pain // Eur J Pharmacol. Pharmacology Research Labs, Astellas Pharma Inc., 21 Miyukigaoka, Tsukuba, Ibaraki 305-8585, Japan. Electronic address: ryosuke.kojima@astellas.com. Pharmacology Research Labs, Astellas Pharma Inc., 21 Miyukigaoka, Tsukuba, Ibaraki 305-8585, Japan. Chemis, 2014. Vol. 723. P. 288–293.
 360. Mahoney J.L. et al. Evidence for involvement of TRPA1 in the detection of vibrations by hair bundle mechanoreceptors in sea anemones // J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol. Department of Biology, University of Louisiana at Lafayette, USA., 2011. Vol. 197, № 7. P. 729–742.