



Табакмахер Валентин Михайлович

В 2010 г. с отличием окончил Дальневосточный федеральный университет (ДВГУ). Будучи студентом, Валентин проявлял живой интерес к исследовательской работе, участвовал в научных конференциях. Не раз становился призером университетских олимпиад по химии, многократно выигрывал конкурсы на получение стипендии губернатора Приморского края и благотворительного фонда В. Потанина, получил грант ректора ДВГУ на проведение студенческих научных исследований. Его дипломная работа, выполненная под руководством д.х.н. М.М. Монастырной и к.ф.-м.н. Е.А. Зеленуга, удостоена премии научно-образовательного центра ДВГУ «Морская биота».

Студентом 3-го курса В.М. Табакмахер пришел в лабораторию химии пептидов ТИБОХ ДВО РАН, где начал осваивать методы белковой химии, молекулярной биологии и компьютерного моделирования молекулярных взаимодействий. По окончании университета продолжил научную работу в лаборатории, поступив в аспирантуру. За время аспирантуры Валентин дважды проходил стажировку в Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН и выполнял совместные исследования с его сотрудниками.

В.М. Табакмахер – руководитель и исполнитель научно-исследовательских проектов, поддержанных грантами РФФИ, ДВО РАН, РНФ, а также выполняемых в рамках комплексной программы фундаментальных исследований ДВО РАН «Дальний Восток». Он является автором и соавтором 23 научных публикаций и 2 патентов Российской Федерации на изобретение.



Синцова Оксана Владимировна

В 2013 г. с отличием окончила обучение по специальности «биохимия» Школы естественных наук ДВФУ и поступила в очную аспирантуру Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова. В лабораторию химии пептидов Оксана пришла в 2010 г. Ее курсовые и дипломная работы, выполненные под руководством к.х.н. И.Н. Гладких, защищены на оценку «отлично», а полученные результаты отмечены стипендией ДВФУ «За особые успехи в научной деятельности».

Аспирантка занимается изучением полифункциональных полипептидов Кунитц-типа, продуцируемых морскими кишечнополостными, актиниями, выделением их в нативном виде и получением их рекомбинантных форм, исследованием структурно-функциональных взаимоотношений и фармакологического потенциала полипептидов.

О.В. Синцова участвует в научно-исследовательских проектах, поддержанных грантом РНФ, а также выполняемых в рамках комплексной программы фундаментальных исследований ДВО РАН «Дальний Восток».

Результаты ее работы были представлены на нескольких международных и межрегиональных научных конференциях.

Оксана Владимировна является автором и соавтором 7 научных публикаций.

В.М. ТАБАКМАХЕР, О.В. СИНЦОВА

Создание генетической экспрессионной конструкции для получения нового полипептида Кунитц-типа актинии *Heteractis crispa*

Методами молекулярного клонирования и генной инженерии созданы генетические экспрессионные конструкции, несущие гены нового полипептида Кунитц-типа актинии Heteractis crispa HCRS 21 и его мутантной формы HCRS 21 (P12L) – потенциальных анальгетиков направленного действия.

Ключевые слова: полипептиды Кунитц-типа, *Heteractis crispa*, анальгетические полипептиды.

Creating of a genetic expression construct for obtaining a new Kunitz-type polypeptide of sea anemone *Heteractis crispa*. V.M. TABAKMAKHER, O.V. SINTSOVA (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok).

A genetic expression constructs containing the genes of novel sea anemone Heteractis crispa Kunitz-type polypeptide HCRS 21 and its mutant form HCRS 21 (P12L) – potential analgesics with directed action – were created using methods of molecular cloning and gene engineering.

Key words: Kunitz-type polypeptides, *Heteractis crispa*, analgesic polypeptides.

Полипептиды семейства Кунитца – широко распространенная группа соединений, выделенных из животных самого разнообразного систематического положения. Исследовательский интерес к соединениям данной группы, обнаруженным в актиниях, обусловлен проявляемой ими биологической активностью: анальгетической, антигистаминной, а также способностью ингибировать протеолитические ферменты, модулировать ионотропные рецепторы и блокировать потенциалзависимые ионные каналы [5].

Недавно с использованием подходов молекулярной биологии в генетическом материале актинии *Heteractis crispa* было обнаружено мультигенное суперсемейство, состоящее из четырех отдельных семейств, содержащих десятки генов, которые кодируют полипептиды с еще не исследованной биологической активностью, структурно гомологичные ингибиторам протеиназ семейства Кунитца [6]. Высокая степень идентичности, а также точечные замены в выведенных аминокислотных последовательностях указывают на то, что эти полипептиды образуют природную комбинаторную библиотеку. Показано, что полипептиды, кодируемые данными семействами генов, отличаются N-концевым дипептидом: GS, RG, GG или GN, в связи с чем они были названы HCGS-, HCRG-, HCGG- и HCGN-полипептидами (две первые буквы в аббревиатуре обозначают вид актинии, *H. crispa*, следующие – N-концевой дипептид). Установление взаимосвязи между структурой и функцией, изучение механизма взаимодействия этих соединений с молекулярными мишенями и тестирование биологической активности *in vivo* открывают пути их применения в качестве инструментов при исследовании биомолекулярных систем и моделей для направленного дизайна лекарственных препаратов.

*ТАБАКМАХЕР Валентин Михайлович – младший научный сотрудник, СИНЦОВА Оксана Владимировна – аспирант (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток). *E-mail: tabval@yandex.ru

Ранее с использованием методов компьютерного моделирования и биоинформатики мы провели системный анализ представителей комбинаторной библиотеки *H. crista*, позволивший отобрать наиболее перспективные (с точки зрения прогнозируемой биологической активности) полипептиды [1]. Было установлено, что представитель группы HCRG-полипептидов, названный HCRS 21, имеет наиболее высокую степень идентичности аминокислотной последовательности с последовательностями выделенных ранее бифункциональных полипептидов APHC1, APHC2, APHC3 (рис. 1), которые помимо ингибирования сериновых протеиназ (трипсин и химотрипсин) способны модулировать болевой ваниллоидный рецептор TRPV1 и оказывать анальгетическое действие [2, 3]. В результате недавних *in vivo* исследований выявлено, что, в отличие от большинства низкомолекулярных антагонистов TRPV1, полипептиды APHC1 и APHC3 оказывают анальгетический эффект, сопровождаемый понижением общей температуры тела [4], вероятно, вследствие совместного действия на болевой ваниллоидный рецептор и протеиназы воспаления [8]. Получение и изучение биологической активности новых анальгетических полипептидов, проявляющих гипотермическую активность, является актуальной исследовательской задачей ввиду перспективы создания на их основе обезболивающих препаратов нового поколения и использования в целях цитопротекции.

Полипептид HCRS 21 не был ранее обнаружен ни в яде, ни в экстрактах нематодостов или цельных актиний *H. crista* (лишь в генетическом материале был найден ген, кодирующий этот полипептид [6]). В связи с этим мы разработали метод получения его рекомбинантной формы с применением подходов гетерологичной экспрессии в прокариотической системе. Целью настоящего исследования являлось создание генетической экспрессионной конструкции, несущей ген полипептида HCRS 21.

Высокий уровень продукции рекомбинантных полипептидов может достигаться за счет правильного выбора экспрессионной системы, оптимизации условий биосинтеза и очистки целевого белка. Поэтому при выборе системы экспрессии было отдано предпочтение вектору рЕТ-32b(+), который предназначен для получения рекомбинантных полипептидов в составе гибридного белка с тиоредоксином в *Escherichia coli*. Преимущество данного вектора заключается в том, что он обеспечивает высокий выход гибридного белка, а тиоредоксин – правильность замыкания дисульфидных связей в целевом полипептиде. Кроме того, получаемый гибридный белок содержит гистидиновый тэг, который способен хелатировать ионы Ni^{2+} , что позволяет на стадии выделения гибридного белка избавиться от большинства балластных компонентов клеточного лизата при помощи хроматографии на металл-аффинной смоле.

На основе аминокислотной последовательности полипептида HCRS 21 была предложена нуклеотидная последовательность кодирующего его гена, оптимизированная специально для гетерологичной экспрессии в *E. coli*. На основе этой последовательности были сконструированы прямые и обратные олигонуклеотидные праймеры. С использованием техники ПЦР из полученных праймеров был собран и амплифицирован фрагмент ДНК длиной 190 н.п. Помимо последовательности, кодирующей HCRS 21, фрагмент содержал



Рис. 1. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей полипептидов Кунитц-типа актинии *H. crista*: APHC1 (UniProt B2G331), APHC2 (UniProt C0HJF4), APHC3 (UniProt C0HJF3), HCRS 21 [6] и HCRS 21 (P12L). Идентичные аминокислотные остатки показаны на сером и темно-сером фонах, переменные – на белом. Реактивный сайт связывания с сериновыми протеиназами выделен черной рамкой. Указаны остатки в положениях P_1 и P_3

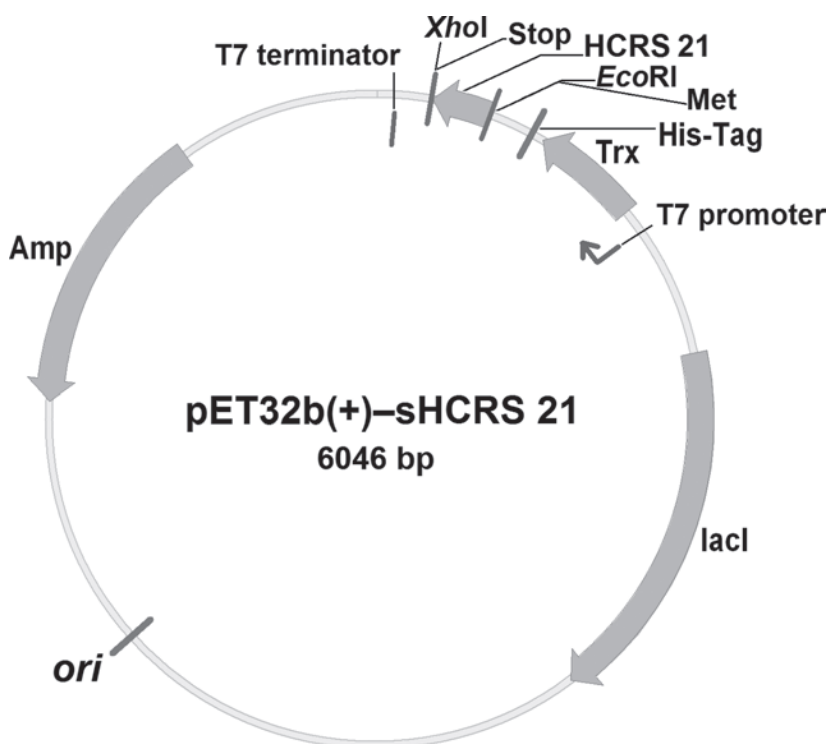


Рис. 2. Физическая карта экспрессионной генетической конструкции pET32b(+)-sHCRS 21. Нуклеотидные последовательности: HCRS 21 – зрелый полипептид Кунитц-типа, Amp – β -лактамаза, Trx – тиоредоксин, lacI – лас-репрессор, His-Tag – гистидиновый тег, EcoRI, XhoI – сайты рестриктаз, Stop – стоп-кодон, Met – кодон метионина, ori – точка начала репликации

сайт рестрикции эндонуклеазы *EcoRI*, следующий сразу после него кодон метионина (необходимый для расщепления гибридного белка под действием BrCN и получения целевого рекомбинантного полипептида) на 5'-концевом участке последовательности, а также стоп-кодон и сайт *XhoI* на 3'-концевом участке.

Аmplифицированный фрагмент субклонировали по сайтам рестрикции *EcoRI* и *XhoI* в составе T7-контролируемого оперона в вектор pET-32b(+). Полученной рекомбинантной плазмидой (рис. 2) трансформировали клетки *E. coli* штамма XL-1. Для подтверждения наличия этих конструкций в клетках проводили ПЦР-скрининг «на колониях». Колонии, содержащие рекомбинантные плазмиды, пересеивали и наращивали клеточную массу в жидкой среде. Полученные генетические экспрессионные конструкции выделяли из бактериальной массы и секвенировали.

В результате секвенирования плазмидной ДНК было выявлено, что в одной из колоний содержатся рекомбинантные плазмиды с уникальной мутацией в гене HCRS 21, изменяющей Pro на Leu в положении 12 аминокислотной последовательности полипептида, обозначенного HCRS 21 (P12L). Данная мутация затрагивает реактивный сайт, участвующий в связывании с сериновыми протеиназами (рис. 1) [7]. Изучение биологической активности полипептида, содержащего такую мутацию, значительно уменьшает необходимость проведения дополнительных мутагенетических работ при исследовании структурно-функциональных взаимосвязей соединений данной группы.

Таким образом, используя методы молекулярного клонирования и генно-инженерные подходы, мы получили две генетические экспрессионные конструкции, несущие гены нового полипептида Кунитц-типа актинии *H. crispa* HCRS 21 и его мутантной формы HCRS 21 (P12L), с целью дальнейшего получения этих полипептидов в рекомбинантной форме и исследования их анальгетического и гипотермического потенциала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зелепуга Е.А., Табакмахер В.М., Чаусова В.Е., Монастырская М.М., Исаева М.П., Козловская Э.П. Взаимодействие полипептидов Кунитц-типа актинии *Heteractis crispa* с болевым ваниллоидным рецептором TRPV1: *in silico* исследование // Биоорг. химия. 2012. Т. 38. С. 185–198.
2. Козлов С.А., Андреев Я.А., Мурашев А.Н., Скобцов Д.И., Дьяченко И.А., Гришин Е.В. Новые полипептидные компоненты с анальгетической активностью из морской анемоны *Heteractis crispa* // Биоорг. химия. 2009. Т. 35. С. 789–798.
3. Andreev Y.A., Kozlov S.A., Koshelev S.G., Ivanova E.A., Monastyrnaya M.M., Kozlovskaya E.P., Grishin E.V. Analgesic compound from sea anemone *Heteractis crispa* is the first polypeptide inhibitor of vanilloid receptor 1 (TRPV1) // J. Biol. Chem. 2008. Vol. 283. P. 23914–23921.
4. Andreev Y.A., Kozlov S.A., Korolkova Y.V., Dyachenko I.A., Bondarenko D.A., Skobtsov D.I., Murashev A.N., Kotova P.D., Rogachevskaja O.A., Kabanova N.V., Kolesnikov S.S., Grishin E.V. Polypeptide modulators of TRPV1 produce analgesia without hyperthermia // Mar. Drugs. 2013. Vol. 11, N 12. P. 5100–5115.
5. Caroline B.F.M., Schwartz E.F. Protease inhibitors from marine venomous animals and their counterparts in terrestrial venomous animals // Mar. Drugs. 2013. Vol. 11, N 6. P. 20692112.
6. Isaeva M.P., Chaushova V.E., Zelepuga E.A., Guzev K.V., Tabakmakher V.M., Monastyrnaya M.M., Kozlovskaya E.P. A new multigene superfamily of Kunitz-type protease inhibitors from sea anemone *Heteractis crispa* // Peptides. 2012. Vol. 34. P. 88–97.
7. Ranasinghe S., McManus D.P. Structure and function of invertebrate Kunitz serine protease inhibitors // Dev. Comp. Immunol. 2013. Vol. 39, N 3. P. 219–27.
8. Zelepuga E., Tabakmakher V., Monastyrnaya M. et al. In silico investigation of interaction between human neutrophil elastase and sea anemone *Heteractis crispa* Kunitz polypeptide // Proc. of the 5th Int. Conf. on Bioinformatics and Biomedical Engineering (ICBBE 2011), Wuhan, China, May 10–12, 2011. Wuhan, 2011. P. 1–4.