

На правах рукописи

Логашина Юлия Александровна

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

Специальность 02.00.10 — Биоорганическая химия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва - 2018

Работа выполнена в лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)

**Научный руководитель:**

Андреев Ярослав Алексеевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

**Официальные оппоненты:**

Купраш Дмитрий Владимирович, доктор биологических наук, профессор, профессор РАН, член-корр. РАН, главный научный сотрудник лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Быстрова Марина Федоровна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной физиологии клетки Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биофизики клетки Российской академии наук.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук

Защита состоится «23» мая 2018 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Макляя, д. 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, а также на сайте института [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru)

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор физико-математических наук



В.А. Олейников

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

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 в сенсорной системе 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 нейrogenного 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 нейrogenное воспаление. Гиперэкспрессия рецептора в коже при атопических и аллергических контактных дерматитах приводит к возникновению хронического зуда. Вредные летучие соединения (акролеин, озон, изотиоцианаты, слезоточивый газ, хлорин) и аллергены взаимодействуют с экспрессирующимся в дыхательной системе TRPA1, 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 рецептора. Образование эндогенных агонистов TRPA1 (например, 4-HNE, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и провоспалительных агентов (например, брадикинин, NGF) сопровождается хроническими заболеваниями дыхательной системы: воспаление тканей, астму, химическую гиперчувствительность, хронический бронхит, хроническое обструктивное заболевание легких. Метилглиоксаль, накапливающийся в клетках при диабете и хронической болезни почек, непосредственно активирует TRPA1 и, как следствие, стимулирует развитие болевой нейропатии. Рецептор также детектирует присутствие воспалительных агентов в кишечнике и передает сигналы

в спинной мозг, одновременно инициируя высвобождение нейропептидов из нервных окончаний. Интерстициальный цистит или синдром болезненного мочевого пузыря вызывает уротоксичный агонист TRPA1, акролеин, который накапливается в моче и повреждает слизистую оболочку. Экспрессия TRPA1 возрастает под влиянием химической среды, которую создают раковые клетки, а противоопухолевая химиотерапия вызывает термическую и механическую аллодинию за счёт сенсбилизации и активации рецептора. Кроме того, антагонисты TRPA1 препятствуют разрушению миелиновой оболочки при ишемии и, как следствие, предотвращают нарушение работы головного мозга.

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.

Известные 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. Найденные в яде тарантула (*Thrixopelmapruriens*) и бразильского странствующего паука (*Phoneutria nigriventer*) два неселективных пептидных модулятора рецептора TRPA1 являются антагонистами потенциал-чувствительных натриевого и кальциевого каналов, соответственно.

**Цель работы:** поиск, выделение и характеристика пептидов морских анемонов, модулирующих активность TRPA1 рецептора.

#### **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*.

## Научная новизна и практическая значимость работы

Исследования показали, что как антагонисты, так и агонисты, играют важную роль в модулировании активности TRPA1 при патологических состояниях. Анальгетический эффект, опосредованный активацией рецептора, может лежать в основе фармакологического действия некоторых нестероидных противовоспалительных препаратов (ацетаминофена, фенаменов, арилалкановых кислот) и экстракта пижмы. 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  $\tau$ -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  $\tau$ -AnmTx Ueq 12-1 является одним из основных компонентов эктодермального секрета актинии *U. eques*. 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.

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 высокие эффективные дозы ( $ED_{50} > 20$  мг/кг), тогда как известные частичные агонисты вызывают сначала боль, а затем аналгезию. 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.

## Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на следующих конференциях: VI Российский симпозиум «Белки и пептиды» (2013, Уфа, Россия); XXVI Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (2014, Москва, Россия); 9th FENS Forum of Neuroscience (2014, Милан, Италия); 39th FEBS Congress and the EMBO Meeting

(2014, Париж, Франция); VII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (2015, Новосибирск, Россия); XXVIII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (2016, Москва, Россия); 5th Champalimaud Neuroscience Symposium (2016, Лиссабон, Португалия); Fourth biennial German-Russian symposium “Molecular neurobiology today and tomorrow” in memory of Eugene Grishin (2017, Москва, Россия); 42nd FEBS Congress “From molecular to cell and back” (2017, Иерусалим, Израиль); «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова», VIII Российский Симпозиум «Белки и пептиды» (2017, Москва, Россия); 9th World Congress of IST, (2017, Хайкоу, Китай).

## **Структура диссертации**

Диссертационная работа изложена на 149 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений, списка цитируемой литературы, включающего 360 ссылки. Диссертация содержит 38 рисунков и 4 таблицы.

## **Публикации**

По материалам работы опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах и 1 патент РФ.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **1. Выделение пептидных модуляторов из ядов морских анемонов и установление их структуры**

Морских анемонов *Metridium senile* и *Urticina eques* собирали у побережья города Тромсе (Норвегия) и путем электрической стимуляции получали эктодермальные секреты и яд. Выделенный экссудат, содержащий пептиды и другие гидрофобные компоненты, обессоливали и концентрировали с помощью твердофазной экстракции (SPE). Для выделения биологически активных компонентов экстракты разделяли с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ. Затем все полученные фракции тестировали на наличие активности по отношению к рецептору, используя метод кальциевого имиджинга на клетках CHO-rTRPA1.

Активный пептид из яда *M. senile* имеет молекулярную массу 3654,4 Да и, в соответствии с номенклатурой пептидов морских анемонов, был назван  $\tau$ -AnmTX Ms 9a-1 (сокращенно Ms 9a-1). N-концевая последовательность была установлена методом деградации по Эдману (34 а.о.). Первичную структуру подтвердил анализ кодирующей пептида кДНК. Полную ДНК последовательность, кодирующую предшественники пептида, получили методом ПЦР (рис. 1 А). Белки-предшественники содержат одинаковый сигнальный пептид (21 а.о.), спейсерную последовательность (6 а.о.), активный пептид (35 а.о.) и его структурные гомологи (27 а.о.), названные  $\tau$ -AnmTX Ms 9a-2 (Ms 9a-2) и  $\tau$ -AnmTX Ms 9a-3 (Ms 9a-3), и различаются между собой несколькими аминокислотными остатками в С-концевой области (рис. 1 Б).

Поиск гомологичных аминокислотных последовательностей с помощью программы BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) обнаружил сходство мотива распределения цистеинов в полипептидной цепи Ms 9a-1 с положением цистеинов в пептидах морских анемонов, относящихся к группе 9a. Трехмерная структура пептидов группы 9a изучена на примере токсина Ugr 9a-1, выделенного из яда актинии *Urticina grebelnyi*. Пептид Ugr 9a-1 образует в пространстве скрученную  $\beta$ -шпильку, которая не стабилизирована межтяжевыми дисульфидными связями.

Пептиды группы 9a действуют на разные клеточные мишени: Vcg-III-23.41 и SHTX-1/SHTX-2 являются слабыми блокаторами калиевых каналов; Ugr 9a-1 ингибирует каналы ASIC3, что вызывает значительный анальгетический эффект; U-SHTX-Sdd1, мишень которого еще не известна, является первым найденным токсином актиний с посттрансляционной модификацией O-HexNAc треонина в первом положении. Все перечисленные выше пептиды не имеют значительного сходства аминокислотной последовательности с первичной структурой Ms 9a-1 (максимум 34% идентичности) (рис. 1 В).

Активный пептид из яда *U. eques* с молекулярной массой 4788,63 Да является первым представителем 12-й подгруппы цистеин-богатых полипептидов морских анемонов, поэтому, в соответствии с классификацией, был назван  $\tau$ -AnmTx Ueq 12-1 (сокращенно Ueq 12-1). Частичная N-концевая последовательность пептида была определена методом деградации по Эдману. Последовательность кДНК предшественника была получена с помощью метода быстрой амплификации 3'- и 5'-концов кДНК (3'- и 5'-RACE) (рис. 2). Полная последовательность белка-предшественника (74 а.о.) содержит сигнальный пептид (15 а.о.) и пропептид (14 а.о.), за которыми следует зрелый пептид, состоящий из 45 а.о. Полная аминокислотная последовательность Ueq 12-1 включает 10 остатков цистеина.

## A

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

DNA: gcactgggttttcgctacaatagaagcgaaaccaaagctgatccaaacatcattgttggtggctgtattaagtgc  
+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: catgtcaaaaatgcctctggttagatgtgttcgtatcgttggtgctggagttgataaagttcctgacttattcagt  
+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: gatccaaacatcattgttggtggctgttctaagtgtcataaacaagattccagtggttaattgtgttcgtatcgcc  
+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: ggctgtggagttgatcctgtaagagacgtgaataaagaccacatgtgttctattccaactgcaagtaaact  
+1fr: **•G•C•G•V•D•P•V•R•D•A•E•ter**

DNA: aagaaaagacactaaataacgggatctataaccattcataattgttaattattaagatcgtataaactgatcg  
DNA: tagttaaagatccttaataataacttgaatagtagtttagtttcaaatggttttcaaatggttatacgtattataa  
DNA: atttacatataaatacgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

## Б

MS9.1 *MKQSLILAVLCLALVFATIEAKPKADPNIIVGGCIKCHVKNASGRCVRIIVGCGVDKVPDLFS*  
MS9.2 *MKQSLILAVLCLALVFATIEAKPKADPNIIVGGCIKCHVKNASGRCVRIIVGCGVDKVPDLFS*

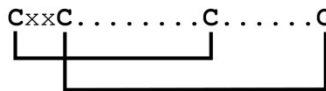
Ms 9a-2 Ms 9a-1

DPNIIVGGCSKCH**KQDS**SGNVCVRIAGCGV**DPVGD**AE .  
DPNIIVGGCSKCH**TEDS**NGNVCVRIAGCGV**EP** .

Ms 9a-3

## В

Ms 9a-1	<b>NIIVGGCIKCHVKNASGRCVRIV-GCGVDKVPDLFS</b>	100%
Ms 9a-2	<b>NIIVGGCSKCHKQDS</b> SGNVCVRIA-GCGV	57.14%
Ms 9a-3	<b>NIIVGGCSKCHTEDS</b> NGNVCVRIA-GCGV	54.29%
U-SHTX-SDD1	<b>TII</b> GAP <b>CRKCE</b> HLDR <b>SGN</b> CVRDWS-CGQEV	34.29%
BcgIII 23.41	<b>NIID</b> VPCRP <b>CYYRDS</b> SGN <b>CVYDQI</b> GCGA	34.29%
SHTX1/2	<b>XII</b> GAP <b>CRR</b> CYHSDGK <b>GG</b> CVRDWS-CGQQ	28.57%
Ugr 9a-1	<b>ISID</b> PP <b>CRF</b> CYHRDG <b>SGN</b> CVYDAYGCGAV	28.57%
Am-1	<b>NVAV</b> PP <b>CGD</b> CYQQVGN <b>T-CVR</b> VPSLCPS	22.86%
Cys-pattern	<b>CxxC</b> ..... <b>C</b> ..... <b>C</b>	



**Рисунок 1.** Структура белков-предшественников MS9.1 и MS9.2. **А.** 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. **Б.** 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. **В.** 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 остаткам в Ms 9a-1. Внизу показана общая схема распределения и замыкания цистеинов для структурного класса 9a.



DNA: ttcaagttttcaa**atg**tgtctgttgatgcttgttttgggagccatgtatgtgcagggttgg  
+1fr: •M•C•L•L•M•L•V•L•G•A•M•Y•V•Q•G•W•

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

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

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

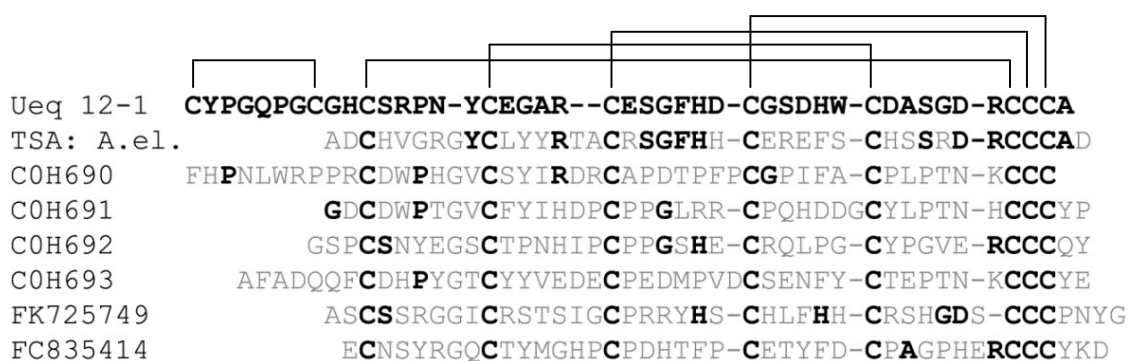
DNA: aaccacttgccgctagtgcacttttagctcgatggtgagaaaacgatgacagtctcgtcaa  
DNA: caagattgacaaaagattgatttagtaaaactaaactaaacgggaataaagtaaaagtgtt  
DNA: aattcataactgaagacttttctttctcaccacgataaacactgtttaagtaggactcaatg  
DNA: aaatgtaagcagtgaaaaaataaaaggctgaatcagcaaaaaaaaaa

**Рисунок 2.** Последовательность ДНК (ENA ID:LT600337), кодирующая белок-предшественник пептида из яда *U. eques*, 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.

Несмотря на то, что пептид из яда *U. eques* не имеет гомологов среди известных охарактеризованных нейротоксинов морских анемонов, в базах данных EST и TSA были найдены некоторые малые цистеин-богатые пептиды (SCRiPs, Small Cysteine Rich Peptides) из кораллов и актиний со сходным расположением Cys в полипептидной цепи. Характерной особенностью Ueq 12-1 и найденных SCRiPs является наличие последовательности из трех цистеинов, расположенных на С-конце цепи (рис. 3). Поскольку все последовательности SCRiPs получены из базы данных кДНК, то отсутствует информация об их функциях и пространственной структуре. Найденные SCRiPs содержат только восемь остатков цистеина, и их распределение аналогично положению восьми С-концевым цистеинам Ueq 12-1 (рис. 3). Помимо Cys-мотивов между Ueq 12-1 и SCRiPs нет существенной гомологии первичной структуры. Вероятно, Ueq 12-1 и SCRiPs имеют общего эволюционного предка и демонстрируют общее эволюционное происхождение токсинов стрекающих кишечнорастворимых.

Пространственная структура Ueq 12-1 была определена с помощью ЯМР-спектроскопии. Согласно полученным данным, пептид имеет укладку похожую на формы буквы «W», и его пространственная структура 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). В ходе анализа трехмерной конфигурации Ueq 12-1 с помощью инструмента PDBeFold были найдены следующие структурные гомологи пептида: 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, причем структура более похожа на дефензины млекопитающих, чем токсины морских анемонов.



**Рисунок 3.** Выравнивание аминокислотной последовательности Ueq 12-1 (идентификатор базы данных UniProt Protein Database: C0HK26) и малых цистеин-богатых пептидов (SCRiPs). TSA: A. el. - 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 остаткам в Ueq 12-1.

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, который присутствует в аминокислотной последовательности Ueq 12-1. В пептиде Ueq 12-1 дисульфидные мостики C3-C8, C4-C7, C5-C9 соответствуют расположению S-S связей в бета-дефензинах, тогда как пары C1-C2 и C6-C10 являются дополнительными, характерными только для данного пептида. Дисульфидная связь C1-C2 стабилизирует уникальную N-концевую петлю Ueq 12-1. 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.

## **2. Исследование биологической активности пептидов *in vitro***

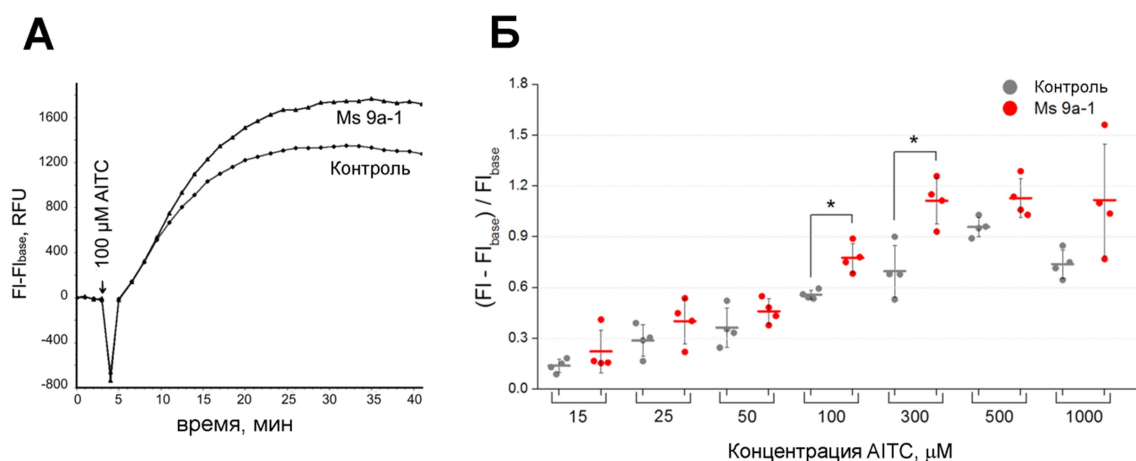
Для проведения функциональных исследований были получены рекомбинантные аналоги Ms 9a-1 и Ueq 12-1. Пептиды тестировали на активность в отношении нескольких ионных каналов: rTRPA1, rTRPV1, hTRPV3, rASIC1a, hASIC3. Ни Ms 9a-1, ни Ueq 12-1 не действовали на rTRPV1, hTRPV3, rASIC1a и hASIC3 в концентрациях 3 мкМ и 20 мкМ, соответственно. Также не наблюдалось прямой активации TRPA1 пептидами ни в кальциевом имиджинге, ни в электрофизиологических экспериментах. Однако, применение Ms 9a-1 или Ueq 12-1 совместно с агонистом TRPA1 (АИТС или диклофенак) вызывало увеличение ответа рецептора на активирующий стимул.

### **2.1. Исследование активности пептида Ms 9a-1**

#### **2.1.1. Потенцирование АИТС-индуцированного ответа клеток CHO-rTRPA1**

Активность Ms 9a-1 измеряли, используя метод кальциевого имиджинга на клетках CHO-rTRPA1. Вход кальция в клетки через TRPA1 был вызван селективным агонистом рецептора, аллилизотиоцианатом (АИТС). Фракция яда актинии *M. senile* после SPE увеличивала на 30% агонист-индуцируемый ответ рецептора (100 мкМ АИТС). Нативный Ms 9a-1 обладал аналогичной активностью (рис. 4 А). Кроме того, рекомбинантный и природный пептиды демонстрировали одинаковую степень потенцирования 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 потенцирующее действие пептида зависит от уровня активации TRPA1. Анализ величины потенцирующего эффекта Ms 9a-1 от концентрации агониста показал дозозависимое увеличение внутриклеточного  $[Ca^{2+}]_i$  в диапазоне концентраций АИТС от 15 мкМ до 500 мкМ. Прединкубация клеток CHO-rTRPA1 с Ms9a-1 (1 мкМ) не изменяла степень потенцирования ни при низких (15-50 мкМ), ни при высоких (500-1000 мкМ) концентрациях АИТС. Максимальное потенцирующее действие Ms 9a-1 (на 35-55%) наблюдалось при средних значениях концентраций агониста (100-300 мкМ) (рис. 4 Б).



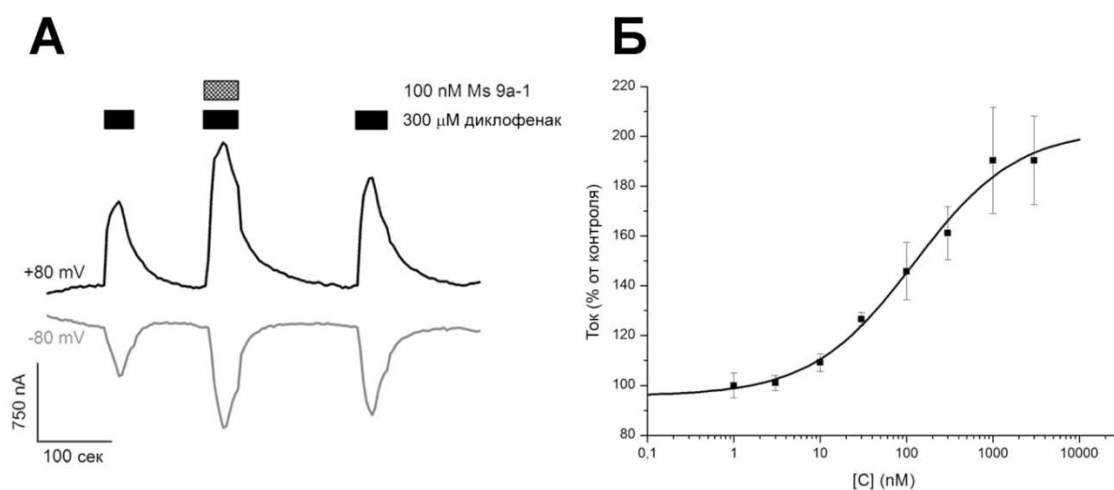
**Рисунок 4.** Ms 9a-1 потенцирует агонист-индуцируемый ответ rTRPA1. **А.** Увеличение концентрации кальция  $[Ca^{2+}]_i$  в клетках CHO-rTRPA1 в ответ на действие 100 мкМ АИТС в отсутствии (контроль) и в присутствии нативного Ms 9a-1 (500 нМ). Представлены графики средних значений ( $n = 4$ ) флуоресцентных сигналов кальциевого имиджинга.  $[Ca^{2+}]_i$  ответы вычисляли как разность интенсивности флуоресценции до ( $F_{l_{base}}$ ) и после добавления агониста ( $F_l$ ). **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 единицы флуоресценции.

### 2.1.2. Электрофизиологическое тестирование на ооцитах *Xenopus laevis*, экспрессирующих rTRPA1

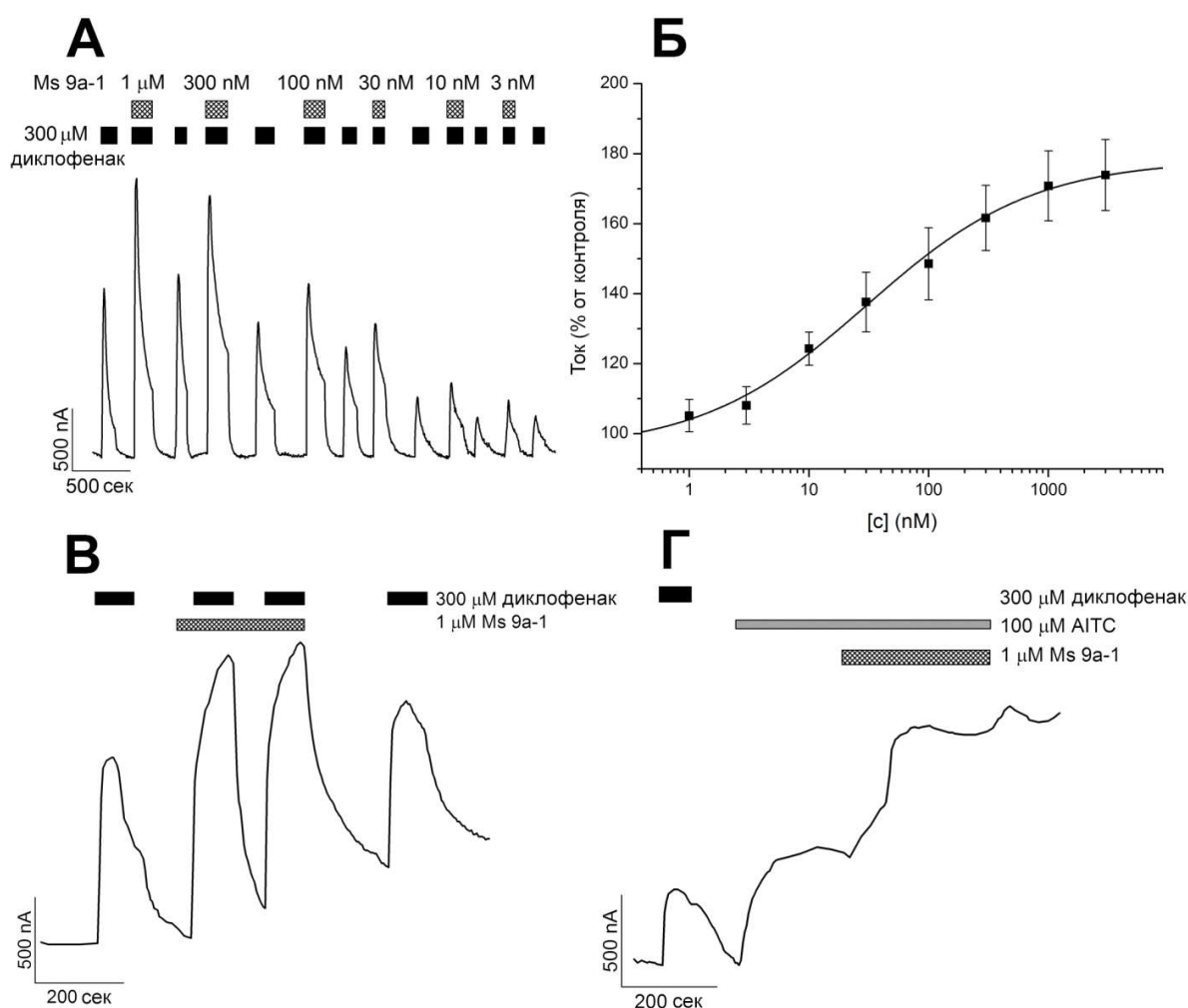
Пептид Ms 9a-1 обладал дозозависимым потенцирующим эффектом, он увеличивал индуцированные диклофенаком ионные токи через TRPA1 в электрофизиологических экспериментах на ооцитах *Xenopus laevis*, экспрессирующих рецептор (рис. 5, 6). Запись ионных токов проводили при повторяющихся импульсах линейного изменения потенциала от -80 мВ до +80 мВ. Ms 9a-1 значительно увеличивал величину входящего тока, индуцированного агонистом TRPA1, но его действие на исходящий ток было нестабильным (рис. 5 А). Максимальный эффект потенцирования диклофенак-индуцированных входящих токов достигал ~90% при концентрации пептида 1 мкМ (рис. 5 Б). Полумаксимальная эффективная концентрация ( $EC_{50}$ ) Ms 9a-1 при -80 мВ составила  $122 \pm 41$  нМ ( $n_H$   $0,79 \pm 0,19$ ).

Устойчивое потенцирующее действие пептида на исходящий ток наблюдалось при использовании протокола записи с повторяющимся ступенчатым изменением потенциала от -20 мВ до +80 мВ (рис. 6). Причём максимальный

эффект потенцирования исходящего тока при концентрации пептида 1 мкМ, в присутствии диклофенака или АГТС в качестве активатора, достигал ~80% (рис. 6 А и Г). 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. 6 Б). Таким образом, действие пептида на агонист-индуцируемые входящие и исходящие токи было различно. В низких концентрациях (до 100 нМ) Ms 9a-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, наблюдался только сильный потенцирующий эффект (рис. 6 В).



**Рисунок 5.** Влияние Ms 9a-1 на диклофенак-индуцированные токи, опосредованные  $\gamma$ TRPA1. **А.** Запись диклофенак-индуцированных ионных токов на ооцитах *X. laevis*, экспрессирующим  $\gamma$ TRPA1, в отсутствие и в присутствии 300 мкМ Ms 9a-1 при линейном изменении потенциала от -80 мВ до +80 мВ. **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.

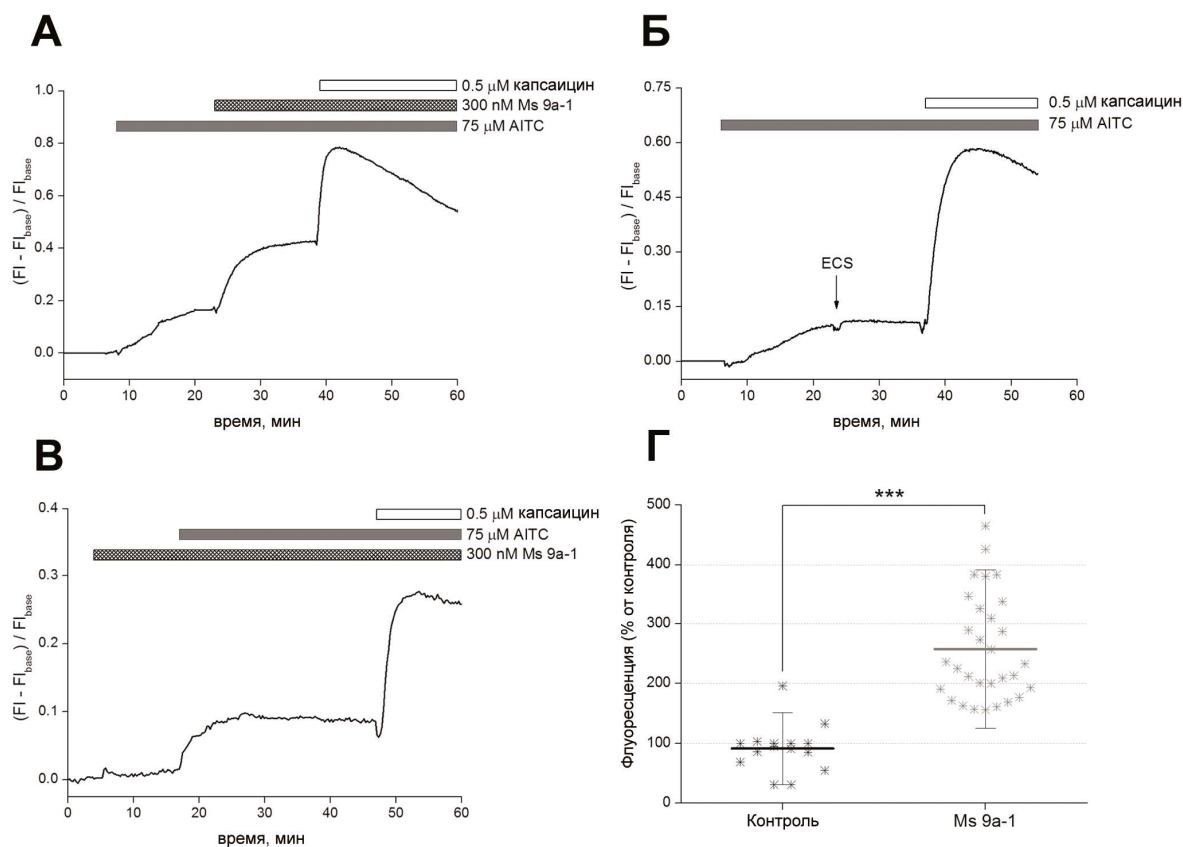


**Рисунок 6.** Влияние Ms 9a-1 на исходящий ток, опосредованный rTRPA1. **А.** Запись диклофенак-индуцированных ионных токов на ооцитах *X. laevis*, экспрессирующих rTRPA1, в отсутствие и в присутствии Ms 9a-1 при ступенчатом изменении потенциала от -20 мВ до +80 мВ. **Б.** Кривая дозозависимости потенцирующего эффекта Ms 9a-1 на диклофенак-индуцированный исходящий ток, опосредованный TRPA1. Каждая точка представляет среднее ( $n = 3-7$ ) значение  $\pm$  S.E. Экспериментальные точки в пределах погрешности ложатся на логистическую кривую. **В.** Ни прединкубация, ни постинкубация с Ms 9a-1 не вызвали десенситилизации диклофенак-индуцированного ответа TRPA1. **Г.** Запись потенцирующего эффекта Ms 9a-1 на АИТС-индуцированные токи, опосредованные TRPA1.

### 2.1.3. 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.

Пептид (300 нМ) вызывал значительное увеличение ( $157 \pm 88\%$ ,  $n = 30$ ) интенсивности флуоресценции в DRG нейронах в присутствии агониста АИТС (рис. 7 А и Г), тогда как применение буфера (ЕСС) не вызывало клеточного ответа (рис. 7 Б и Г). Применение Ms 9a-1 без агониста TRPA1 не изменяло интенсивность флуоресцентного сигнала в культивируемых чувствительных нейронах (рис. 7 В).



**Рисунок 7.** Потенцирующий эффект Ms 9a-1 на АИТС-индуцированное увеличение  $[Ca^{2+}]_i$ , опосредованное TRPA1, в культивированных крысиных DRG нейронах. **А.** В присутствии Ms 9a-1 (300 нМ) увеличивалась интенсивность флуоресценции клеток в ответ на применение АИТС. **Б.** Добавление буферного раствора (ЕСС) 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 ( $F_{i,base}$ ) и после добавления образцов ( $F_i$ ) к базовому уровню сигнала ( $F_{i,base}$ ). **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); \*\*\*,  $p < 0,001$  (двусторонний t-тест).

## 2.2. Исследование активности пептида Ueq 12-1

### 2.2.1. Антибактериальная активность

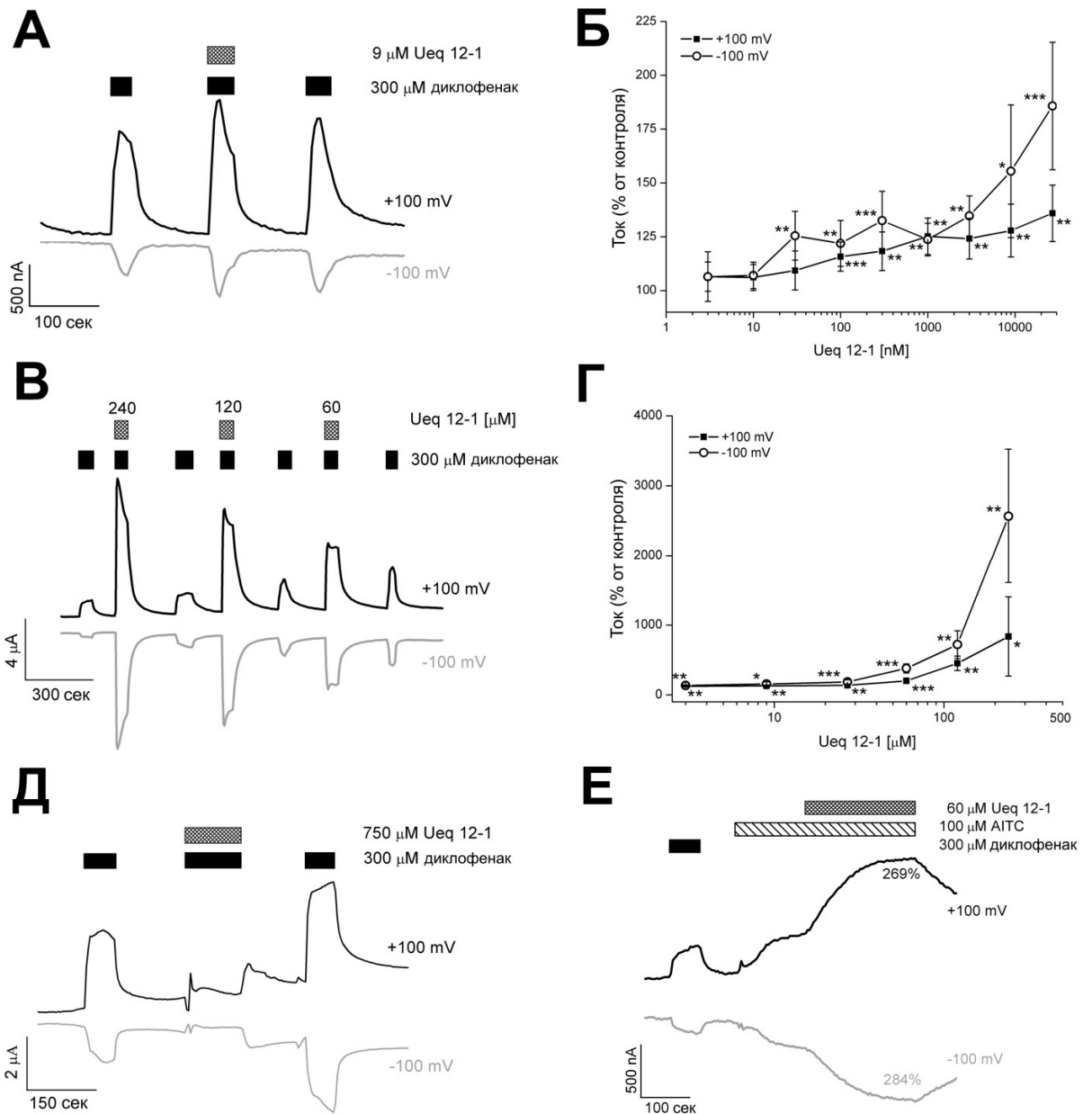
Экстракт яда морской анемоны *U. eques* после SPE подавлял рост грамположительных бактерий *Corynebacterium glutamicum* (минимальная действующая концентрация 80 мкг/мл), поэтому очищенный нативный Ueq 12-1 тестировали на наличие антимикробной активности в отношении выбранных бактериальных штаммов. Исследование 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 чувствительностью к антибактериальным соединениям, что увеличивает вероятность обнаружения минимальных количеств антимикробных пептидов. 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).

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. Однако, фактически, тройной  $\beta$ -лист с характерным расположением дисульфидных мостиков обеспечивает стабильность структуры дефензинов, но не является обязательной детерминантой антимикробной активности.

### 2.2.2. Потенцирующий эффект пептида на активность рецептора TRPA1

Было установлено, что Ueq 12-1 в концентрации 1 мкМ увеличивает на  $35 \pm 10\%$  АИТС-индуцированный кальциевый ток, опосредованный TRPA1, в кальциевом имиджинге на клетках СНО, экспрессирующих 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 на ооцитах, экспрессирующих TRPA1, с использованием в качестве активатора 300 мкМ диклофенака (рис. 8).





**Рисунок 8.** Влияние Ueq 12-1 на величину ионных токов, опосредованных TRPA1, в присутствии агонистов, диклофенака (300 мкМ) или АИТС (100 мкМ). **А.** Потенцирующий эффект 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 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 при применении 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

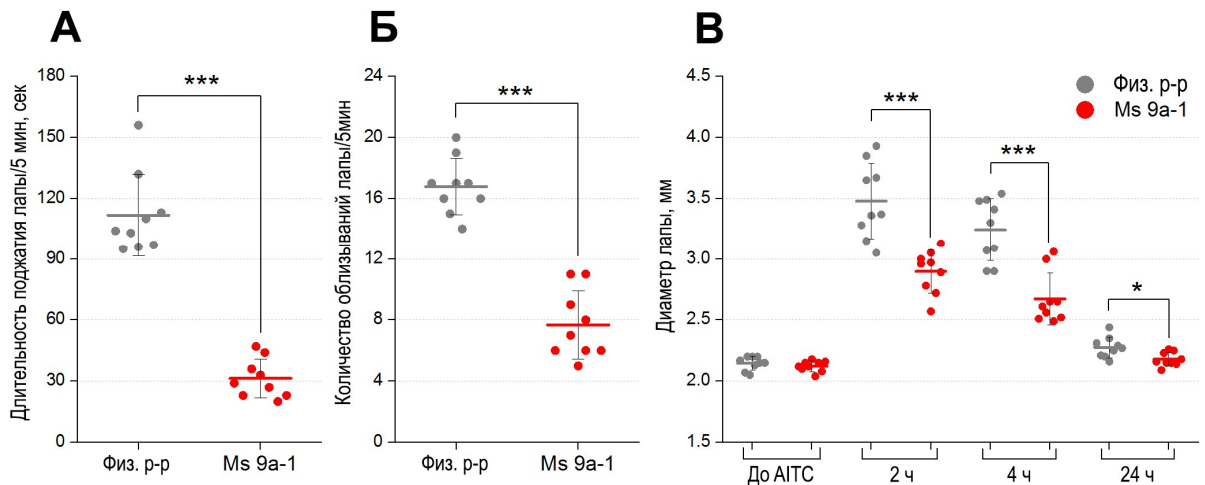
токи до 132-186% (рис. 8 А, Б). Более высокие концентрации пептида вызывали еще большее увеличение токов: в концентрации 60 мкМ -  $200 \pm 23\%$  (исходящий ток) и  $378 \pm 65\%$  (входящий ток), 120 мкМ -  $453 \pm 104\%$  (исходящий ток) и  $719 \pm 98\%$  (входящий ток) (данные представлены в виде средних величин  $\pm$  S.D.) (рис. 8 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. 8 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. 8 Д). Потенцирующий эффект пептида также наблюдался для АИТС-индуцированных токов, опосредованных TRPA1 (рис. 8 Е). Ueq 12-1 в концентрации 60 мкМ не модулировал активность крысиного TRPV1 или человеческого TRPV3 в кальциевом имиджинге на клетках 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. 8 Б, Г), потому что пептид в высоких концентрациях полностью блокировал ответ рецептора.

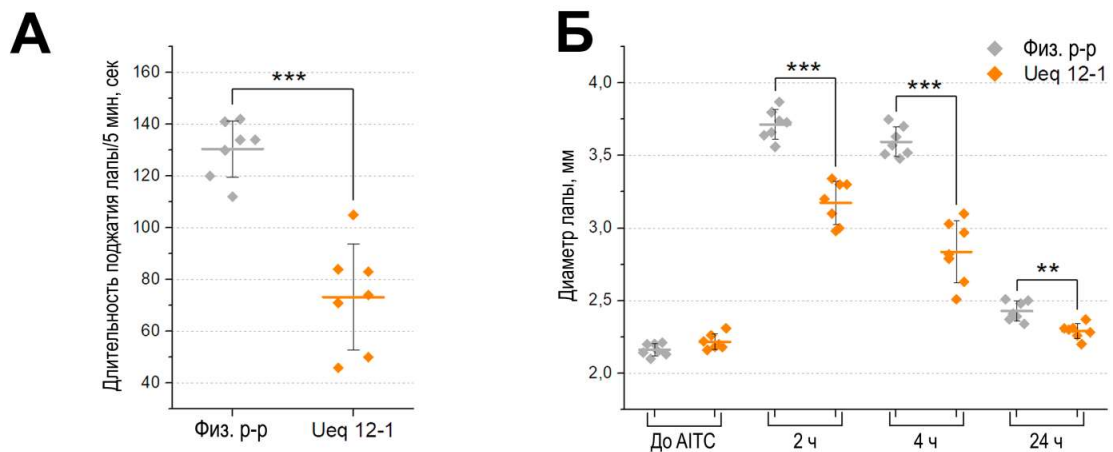
### **2.3. Исследование биологической активности пептидов *in vivo***

Агонисты TRPA1 вызывают боль и нейрогенное воспаление, сопровождающееся тепловой и механической гипералгезией. 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 являются агонистами рецептора и не вызывают боль. Поскольку Ms 9a-1 и Ueq 12-1 значительно увеличивали ответ TRPA1 на действие АИТС *in vitro*, было решено проверить, может ли пептид модулировать ответ рецептора на применение этого агониста у мышей.

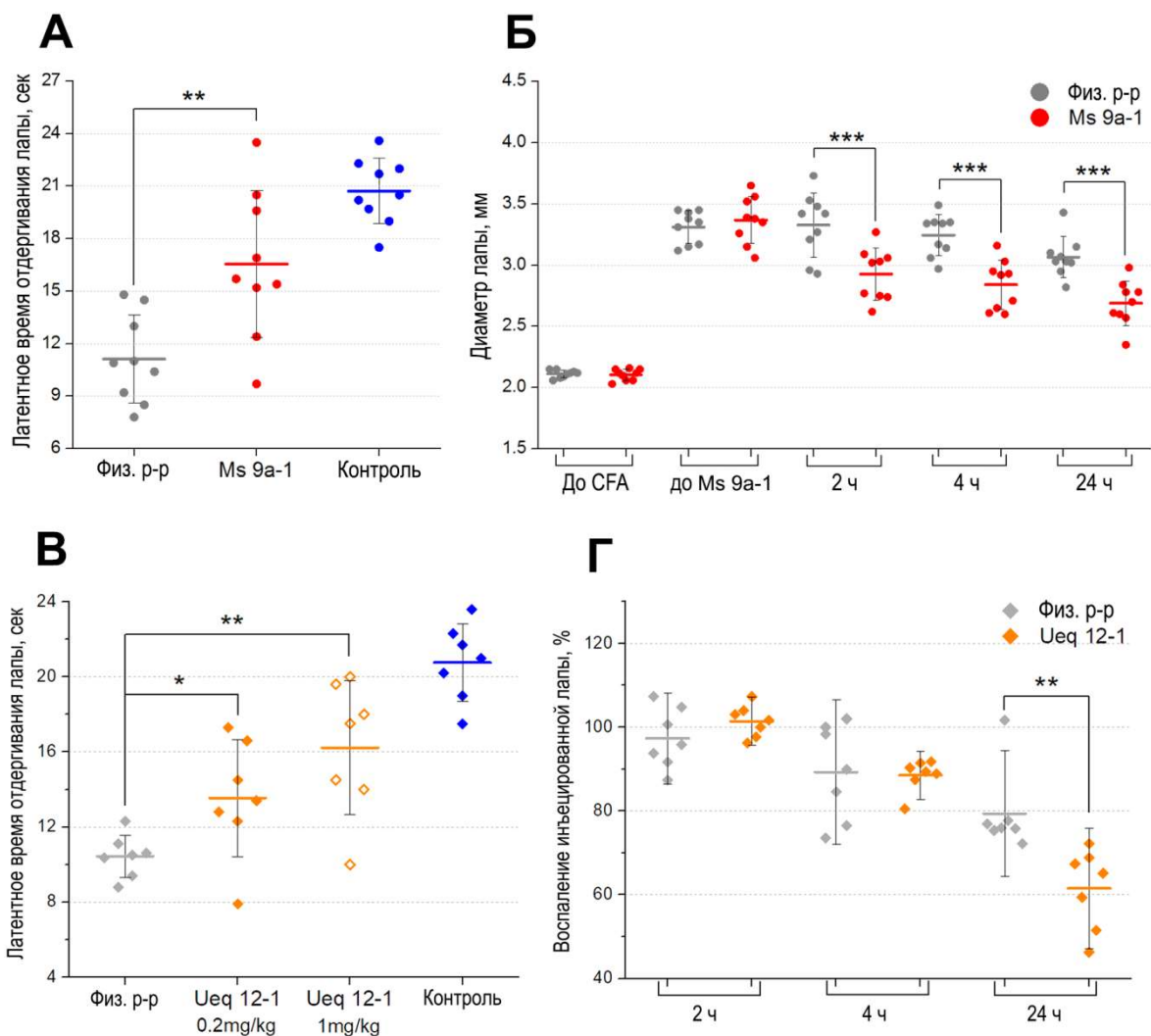
Введение АИТС (10-20 мкл, 0,5% в физиологическом растворе) в подошву задней лапы мыши стимулировало интенсивное облизывание и поджатие инъецированной лапы, а также ее отек в результате нейрогенного воспаления. Внутривенное введение пептидов за 30 минут до инъекции агониста значительно снижало АИТС-индуцированное ноцицептивное поведение у мышей (рис. 9, 10).



**Рисунок 9.** 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 (А) длительность поджатия лапы (~78%) и (Б) количество облизываний лапы (~55%), измеряемые в течение 5 минутного интервала после инъекции АИТС. В. Ms 9a-1 (0,3 мг/кг внутривенно) уменьшал отек лапы на 42% и 50% по сравнению с контролем через 2 и 4 ч 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).



**Рисунок 10.** Эффективность Ueq 12-1 *in vivo* в тесте АИТС-индуцированного болевого ответа. А. Ueq 12-1 (0,2 мг/кг внутривенно) значительно снижал индуцированную инъекцией АИТС ноцицептивную реакцию (длительность поджатия лапы уменьшалась на ~43%). Б. Ueq 12-1 (0,2 мг/кг внутривенно) уменьшал отек лапы на 39% и 57% через 2 и 4 ч после введения АИТС. 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.



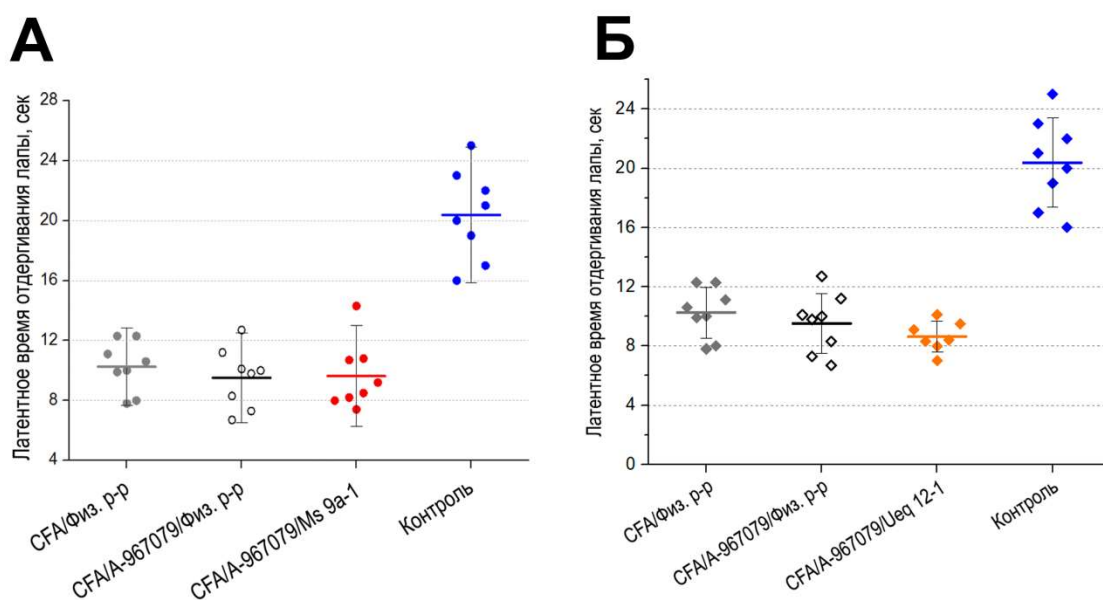
**Рисунок 11.** Эффективность Ms 9a-1 и Ueq 12-1 *in vivo* в тестах CFA-индуцированного воспаления. **А.** Пептид Ms 9a-1 (0,3 мг/кг внутривенно) снижает (~56%) длительность задержки перед отдергиванием лапы от горячей пластины в тесте CFA-индуцированной гипералгезии (n = 9 для каждой группы). **Б.** Ms 9a-1 (0,3 мг/кг внутривенно) уменьшает отек лапы, вызванный введением CFA, на 32, 35 и 39% по сравнению с контролем через 2, 4 и 24 ч (n = 9 для каждой группы) после инъекции пептида. **В.** Влияние пептида Ueq 12-1 (0,2 и 1 мг/кг внутривенно) на длительность задержки перед отдергиванием лапы от горячей пластины в тесте CFA-индуцированной гипералгезии (снижение на 30% и 56%, соответственно) (n = 7 для каждой группы). **Г.** Ueq 12-1 (0,2 мг/кг внутривенно) уменьшает отек лапы, вызванный введением CFA, на 27% через 24 после инъекции пептида (n = 7 для каждой группы). 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).

Влияние Ms 9a-1 и Ueq 12-1 на общий воспалительный процесс было исследовано с использованием модели воспаления в ответ на введение полного

адьюванта Фрейнда (CFA). Инъекция CFA в заднюю лапу мыши вызывает отек лапы и повышенную чувствительность к механическим и термическим раздражителям (гипералгезия). Оба пептида при внутривенном введении снижали CFA-индуцированную термическую гипералгезию в течение 30 мин после инъекции и значительно уменьшали отек лапы (рис. 11).

Наблюдаемый в поведенческих тестах эффект после инъекции пептида не был результатом седации или нарушения поведения, поскольку введение Ms 9a-1 и Ueq 12-1 не влияло на нормальное поведение мышей в тесте «открытое поле» по сравнению с контрольной группой. Таким образом, применение пептидов *in vivo* изменяло воспалительный ответ.

Применение селективного антагониста TRPA1, A-967079, (20 мг/кг перорально) за 1 ч до введения пептидов полностью блокировало их влияние на CFA-индуцированную термическую гипералгезию (рис. 12). Следовательно, активация TRPA1 необходима для опосредованного пептидами ноцицептивного эффекта. Следует отметить, что в отличие от Ms 9a-1 и Ueq 12-1, антагонисты TRPA1, HC-030031 и A-967079, не влияют на CFA-индуцированную термическую гипералгезию. Таким образом, действие пептидов *in vivo* отличается от эффекта ингибирования TRPA1.



**Рисунок 12.** Селективный антагонист TRPA1, A-967079, (20 мг/кг перорально) полностью блокировал эффект пептидов **(А)** Ms 9a-1 (0,3 мг/кг внутривенно) и **(Б)** Ueq 12-1 (0,2 мг/кг внутривенно) на CFA-индуцируемую термическую гипералгезию (n = 7-8). Результаты представлены в виде средних значений ± S.D.

### 3. Механизм действия Ms 9a-1 и Ueq 12-1

В настоящее время известно о наличии анальгетических свойств у ряда агонистов TRPA1. Например, было обнаружено, что некоторые активаторы TRPA1 - *p*-бензохинон (*p*-BQ) и *N*-ацетил-*p*-бензохинонимин (NAPQI) (метаболиты ацетаминофена) - являются мощными анальгетиками. 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 DRG нейронов, а также обширному и устойчивому ингибированию потенциал-зависимых кальциевых и натриевых каналов.

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. Таким образом, результат активации TRPA1 агонистами зависит от их химических свойств, которые определяют скорость десенситизации TRPA1 и способность нейронов отвечать на последующие 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, простагландины, газотрансмиттеры NO и H<sub>2</sub>S, а также нитроксил анион (HNO), индуцируют незначительную активацию TRPA1 в физиологических концентрациях, при этом пептиды могут потенцировать их действие (рис. 5, 6 и 8) и десенситизировать нейроны, экспрессирующие TRPA1, таким же образом, как и *p*-BQ, NAPQI или партенолид. Десенситизированные нейроны не способны отвечать на действие селективного агониста TRPA1, что согласуется с анальгетическим эффектом у мышей в ответ на применение пептидов и АИТС. Такой же эффект может быть достигнут после применения селективного антагониста TRPA1 в высоких концентрациях. Также десенситизация TRPA1-экспрессирующих нейронов может снижать воспаление и термическую

гипералгезию, вызванные введением CFA, что отличает потенцирующий эффект пептидов от действия низкомолекулярных антагонистов.

У анемон пептиды Ms 9a-1 и Ueq 12-1, по-видимому, выполняют защитные функции. Антибактериальная активность Ueq 12-1 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.

## **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 токсинов морских анемон.
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 полным адьювантом Фрейнда.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

### Статьи в рецензируемых журналах:

- 1) Я.А. Андреев, **Ю.А.Логашина**, К.И. Лубова, А.А. Василевский, С.А. Козлов. Боль, воспаление и другие неприятности: обратная сторона ощущений. Природа, 2016, №12, стр. 3-9.
- 2) **YuliaA. Logashina**, IrinaV. Mosharova, YuliaV. Korolkova, IrinaV. Shelukhina, IgorA. Dyachenko, VictorA. Palikov, YuliaA. Palikova, ArkadiiN. Murashev, SergeyA. Kozlov, KlaraStensvåg, andYaroslavA. Andreev. Peptide from Sea Anemone *Metridium senile* Affects Transient Receptor Potential Ankyrin-repeat 1 (TRPA1) Function and Produces Analgesic Effect. The Journal of Biological Chemistry, 2017, vol. 292, no. 7, pp. 2992–3004.
- 3) **Yulia A. Logashina**, RunarGjerpSolstad, Konstantin S. Mineev, Yuliya V. Korolkova, Irina V. Mosharova, Igor A. Dyachenko, Victor A. Palikov, Yulia A. Palikova, Arkadii N. Murashev, Alexander S. Arseniev, Sergey A. Kozlov, KlaraStensvåg, Tor Haug, and Yaroslav A. Andreev. New Disulfide-Stabilized Fold Provides Sea Anemone Peptide to Exhibit Both Antimicrobial and TRPA1 Potentiating Properties. Toxins, 2017, vol. 9, no. 5,pii: E154.

### Патенты:

- 1) Козлов С.А., Андреев Я.А., Гришин Е.В., **Логашина Ю.А.**, Королькова Ю.В., Мошарова И.В., Мурашев А.Н. Анальгетический пептид из морской анемоны. Патент РФ № 2614759 (дата приоритета 12.02.2016, дата регистрации 29.03.2017), (заявка на патент № 2016104705 от 12.02.2016).

### Тезисы докладов на конференциях:

- 1) **Шапранова Ю.А.**, Андреев Я.А., Мошарова И.В., Королькова Ю.В., Гришин Е.В. Поиск модуляторов рецептора TRPA1. Материалы VI Российского симпозиума «Белки и пептиды», Уфа, 11-15 июня 2013 г., стр.212.
- 2) **Шапранова Ю.А.**, Андреев Я.А., Мошарова И.В., Королькова Ю.В., Гришин Е.В. Модуляторы рецептора TRPA1 из актиний. Сборник тезисов XXVI Зимней молодёжной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 10-14 февраля 2014 г., стр. 99.
- 3) **Shapranova YA**, Andreev YA, Stensvåg K, Mosharova IV, Korolkova YV, Grishin EV. Search for TRPA1 modulators. 9th FENS Forum of Neuroscience, Милан, Италия, 5–9 июля, 2014, p. 119.
- 4) **Shapranova YA**, Andreev YA, Stensvåg K, Mosharova IV, Korolkova YV, Grishin EV. Search for TRPA1 modulators. Abstracts of the 39th FEBS Congress and the EMBO Meeting 2014, Париж, Франция, 20 августа–4 сентября, 2014, FEBS Journal, 2014, 281 (Suppl.1), p. 165.
- 5) **Логашина Ю.А.**, Андреев Я.А., Мошарова И.В., Королькова Ю.В., Гришин Е.В. Модуляторы хеморецептора TRPA1 из яда анемоны *Metridium senile*.



- VII Российский симпозиум «Белки и пептиды», Новосибирск, 12-17 июля 2015 г., стр. 248.
- 6) **Логашина Ю.А.**, Андреев А.А., Королькова Ю.В., Мошарова И.В., Гришин Е.В. Пептидный лиганд TRPA1 рецептора из яда актинии *Metridium senile* обладает анальгетическим эффектом *in vivo*. Сборник тезисов XXVIII Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 8-11 февраля 2016 г., стр. 56.
  - 7) **Logashina YA**, Mosharova IV, Korolkova YV, Stensvåg K, Andreev YA. TRPA1 modulator from sea anemone *Metridium senile* reduced antinociceptive behavior in mice. 5th Champalimaud Neuroscience Symposium. Лиссабон, Португалия, 21–25 сентября 2016, p. 123.
  - 8) Andreev YA, **Logashina YA**, Stensvag K, Korolkova YV. Natural antimicrobial peptide potentiates TRPA1 receptor and produces analgesic effects in mice. 5th Champalimaud Neuroscience Symposium. Лиссабон, Португалия, 21–25 сентября 2016, p. 120.
  - 9) Andreev Y., **Logashina Y**. Peptide modulators of TRPA1 receptor. Fourth biennial German-Russian symposium “Molecular neurobiology today and tomorrow” in memory of Eugene Grishin, 5–9 апреля 2017, Москва, p. 17.
  - 10) Y. Andreev, E. Maleeva, **Y. Logashina**. Structure-functional analyzes of the analgesic sea anemone peptide potentiating TRPA1. The FEBS Journal. Volume 284. Supplement 1. p 251. 42nd FEBS Congress “From molecular to cell and back”. 10-14 сентября, 2017, Иерусалим, Израиль.
  - 11) **Ю.А. Логашина**, Р.Г. Солстад, Ю.В. Королькова, И.В. Мошарова, С.А. Козлов, К. Стенсвог, Т. Хауг, Я.А. Андреев. Пептид из морской анемоны *Urticina eques* обладает антимикробной и анальгетической активностью. «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова», VIII Российский Симпозиум «Белки и пептиды». Москва, ИБХ РАН, 18–22 сентября 2017, ActaNaturae, спецвыпуск 2017, стр. 45.
  - 12) **Y.A. Logashina**, Y.V. Korolkova, I.V. Mosharova, K. Stensvag, S.A. Kozlov, Y.A. Andreev. Analgesic peptides from sea anemones target TRPA1 receptor. 9th World Congress of IST, Program&Abstracts. 24-31 октября 2017, Хайкоу, Китай, p. 139.
  - 13) **Y.A. Logashina**, R.G. Solstag, Y.V. Korolkova, I.V. Mosharova, S.A. Kozlov, K. Stensvag, T. Houg. Y.A. Andreev. Sea anemone peptide from *Urticina eques* potentiates TRPA1 receptor and produce antimicrobial effect. 19th World Congress of IST, Program&Abstracts. 24-31 октября 2017, Хайкоу, Китай, p. 184.