



### Дарья Владимировна Попкова

Сотрудник лаборатории молекулярной фармакологии и биомедицины Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН. В 2021 г. с отличием окончила Дальневосточный федеральный университет (Школа естественных наук) по направлению «Биология». В настоящее время обучается на 1 курсе магистратуры ДВФУ по направлению «Биотехнология в разработке и производстве природных биопрепаратов и продуктов на их основе».

Объектом изучения молодого ученого являются пептидные ингибиторы  $\alpha$ -амилаз млекопитающих, обнаруженные в яде морских анемонов. Дарья Владимировна принимает участие в научно-исследовательском проекте, поддержанном грантом РФФИ № 21-74-20147, целью которого является изучение фармакологического потенциала пептидных ингибиторов  $\alpha$ -амилаз и их использования как основы для дизайна новых лекарственных средств для эффективного гликемического контроля у пациентов с ожирением и сахарным диабетом. Результаты научной работы были представлены на XVIII Всероссийской молодежной школе-конференции по актуальным проблемам химии и биологии (Владивосток, 2021 г.) и региональной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых по естественным наукам (Владивосток, 2022 г.).

Научная статья

УДК 577.112

DOI: 10.37102/0869-7698\_2022\_226\_06\_13

## Оптимизация условий получения рекомбинантного ингибитора $\alpha$ -амилаз млекопитающих, магнификамида, морской анемоны *Heteractis magnifica*

Д.В. Попкова

*Дарья Владимировна Попкова*

лаборант

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, ДВО РАН,

Владивосток, Россия

daria.vladipo@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0002-7463-5653>

**Аннотация.** Подобраны условия выделения рекомбинантного ингибитора  $\alpha$ -амилаз млекопитающих, магнификамида, морской анемоны *Heteractis magnifica*. Выявлено, что проведение процедуры рефолдинга гибридного белка приводит к существенному увеличению выхода рекомбинантного пептида с корректной пространственной укладкой в сравнении с выделением пептида без проведения процедуры рефолдинга.

**Ключевые слова:** диабет, ингибиторы  $\alpha$ -амилаз, морские анемоны, *Heteractis magnifica*

**Для цитирования:** Попкова Д.В. Оптимизация условий получения рекомбинантного ингибитора  $\alpha$ -амилаз млекопитающих, магнификамида, морской анемоны *Heteractis magnifica* // Вестн. ДВО РАН. 2022. № 6. С. 143–148. [http://dx.doi.org/10.37102/0869-7698\\_2022\\_226\\_06\\_13](http://dx.doi.org/10.37102/0869-7698_2022_226_06_13)

**Благодарности.** Автор выражает благодарность к.б.н. О.В. Синцовой и к.х.н. Р.С. Калиной за поддержку в реализации исследований. Определение молекулярной массы производили на оборудовании Дальневосточного центра структурных молекулярных исследований (ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии) (ЦСМИ ТИБОХ ДВО РАН).

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 21–74–20147.

Original article

## Condition optimization to obtain recombinant mammalian $\alpha$ -amylase inhibitor, magnificamide, sea anemone *Heteractis magnifica*

D.V. Popkova

*Daria V. Popkova*

Laboratory Assistant

G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok, Russia

[daria.vladipo@yandex.ru](mailto:daria.vladipo@yandex.ru)

<https://orcid.org/0000-0002-7463-5653>

**Abstract.** The obtaining conditions of recombinant inhibitor of mammalian  $\alpha$ -amylase, magnificamide, sea anemone *Heteractis magnifica* were optimized. The fusion protein refolding procedure was revealed to lead to a significant yield increase of the recombinant peptide with correct spatial structure in comparison with the peptide isolation without the refolding.

**Keywords:** diabetes,  $\alpha$ -amylase inhibitors, sea anemones, *Heteractis magnifica*

**For citation:** Popkova D.V. Condition optimization to obtain recombinant mammalian  $\alpha$ -amylase inhibitor magnificamide, sea anemone *Heteractis magnifica*. *Vestnik of the FEB RAS*. 2022;(6):143-148. (In Russ.). [http://dx.doi.org/10.37102/0869-7698\\_2022\\_226\\_06\\_13](http://dx.doi.org/10.37102/0869-7698_2022_226_06_13).

**Acknowledgments.** The author is grateful to Ph.D. (biology) O.V. Sintsova and Ph.D. in Chemistry R.S. Kalina for support in the implementation of research. Molecular mass determination was carried out on the equipment of the Collective Facilities Center “The Far Eastern Center for Structural Molecular Research (NMR/MS) PIBOC FEB RAS”

**Funding.** This work was supported by the Russian Science Foundation Grant No. 21-74-20147.

В настоящее время известно множество биологически активных веществ, продуцируемых наземными животными и растениями. При этом существуют

недостаточно изученные морские организмы, являющиеся ценным источником соединений, которые могут быть использованы в фармацевтической и многих других важных отраслях промышленности. Заслуживают внимания животные типа Стрекающие (*Cnidaria*): их метаболиты обладают высокой биологической активностью и характеризуются значительным разнообразием, что обуславливает широкий спектр действия в отношении различных мишеней. Большинство из этих соединений являются токсинами белковой природы, способными оказывать влияние на различные сигнальные и метаболические пути организма [1]. Недавно для группы токсинов была обнаружена способность ингибировать панкреатическую  $\alpha$ -амилазу, осуществляющую в организме гидролиз крахмала до моно- и олигосахаридов, что может быть использовано в качестве потенциального лекарственного средства против сахарного диабета второго типа [2]. В клинической картине данного заболевания наблюдается чрезмерное повышение постпрандиального (после еды) уровня глюкозы в крови, что приводит к повреждению нервной, выделительной, сердечно-сосудистой и других систем и органов [3]. Замедление переваривания крахмала за счет ингибирования фермента играет ключевую роль в контроле уровня глюкозы в крови после еды. Фармацевтические препараты миглитол (Glyset<sup>TM</sup>), воглибоза (Voglib<sup>TM</sup>) и акарбоза (Precose<sup>TM</sup> или Glucobay<sup>TM</sup>) снижают активность  $\alpha$ -глюкозидаз, однако из-за низкой ингибиторной активности требуется использование высоких концентраций действующего вещества, что приводит к появлению побочных эффектов со стороны ЖКТ, нервной системы и печени. В связи с этим актуальная задача в фармакологии и биотехнологии – поиск более эффективных препаратов, вызывающих меньшие побочные эффекты. Эта задача может быть отчасти решена с помощью ингибиторов  $\alpha$ -амилаз, обнаруженных в морских анемонах *Stichodactyla helianthus* и *Heteractis magnifica*: хелиантамида и магнификамида [2, 4]. Данные пептиды (44 а. о., 4,7 кДа) могут быть предложены для создания на их основе пероральных лекарственных препаратов, поскольку они принадлежат к семейству  $\beta$ -дефензинов, пространственная структура которых характеризуется высокой устойчивостью как к протеолизу, так и к кислотному гидролизу за счет компактного фолда, состоящего из нескольких антипараллельно расположенных  $\beta$ -листов, стабилизированных тремя консервативно расположенными дисульфидными связями [5].

Как правило, при выделении и работе с нативными пептидами возникает ряд затруднений, которые связаны с трудоемким процессом разделения близких по физико-химическим свойствам молекул, малыми количествами выделенного целевого вещества и необходимостью использования живых организмов, что приводит к сокращению популяции морских животных. Современные методы генной инженерии, в том числе технологии рекомбинантных ДНК, позволяют получать белковые молекулы без причинения вреда морскому биоценозу и с высоким выходом высокоочищенного продукта путем экспрессии пептидов в бактериальных или дрожжевых системах. Ранее нами была разработана схема (рис. 1) экспрессии и выделения рекомбинантного магнификамида в *Escherichia coli* с выходом 4 мг/л клеточной культуры [4]. Однако лимитирующими факторами получения конечного продукта являлись низкая эффективность гидролиза гибридного белка энтерокиназой и образование большого количества целевого пептида с некорректным фолдингом.

В данной работе была поставлена задача оптимизировать условия выделения целевого пептида путем изменения концентрации энтерокиназы и проведения

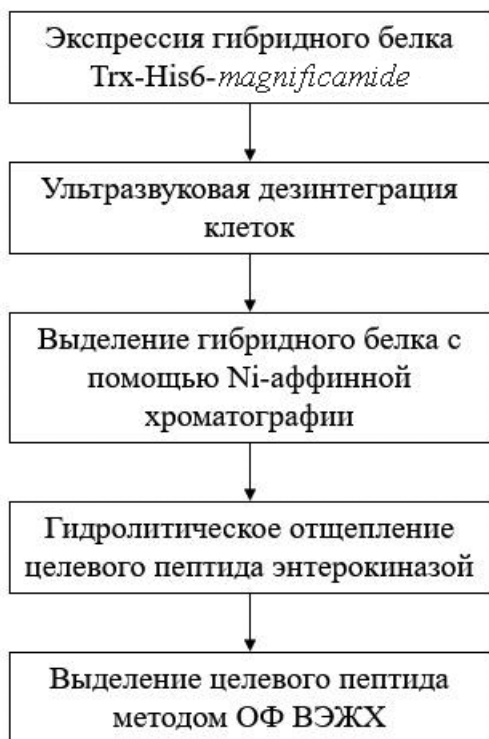


Рис. 1. Общая схема экспрессии и выделения рекомбинантного магнIFIкамида

каха Петри, содержащих LB-агар с добавлением антибиотика карбенициллина (Invitrogen, США) (100 мг/л). Экспрессию гибридного белка индуцировали добавлением изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) (Invitrogen, США) до конечной концентрации 0,2 мМ и проводили в течение 18 ч при перемешивании (180 об/мин) в 1 л жидкой питательной среды LB (10 г/л триптон, 10 г/л хлорид натрия, 5 г/л дрожжевой экстракт; Difco, BD, США) на логарифмической фазе роста бактериальных клеток при температуре 18 °С при достижении оптической плотности  $A_{600} = 0,6-0,8$ . Клетки после экспрессии осаждали центрифугированием и разрушали методом ультразвуковой дезинтеграции, после чего выделяли белок из лизата методом металл-аффинной хроматографии с  $Ni^{2+}$ -NTA-агарозой в качестве носителя.

Для оптимизации условий выделения магнIFIкамида раствор гибридного белка был разделен на две части, в одной из которых проведена процедура рефолдинга с последующим гидролизом энтерокиназой, в другой – гидролиз энтерокиназой с последующим рефолдингом. Рефолдинг гибридного белка осуществляли по ранее описанному методу рефолдинга слитых с тиоредоксином пептидов, содержащих несколько дисульфидных связей [6], согласно которому к раствору белка добавляли окисленный и восстановленный L-глутатион (AppliChem, Германия) до концентрации 1 мМ и 4 мМ соответственно и инкубировали при температуре 10 °С в течение 5 дней, после чего добавляли энтерокиназу с расчетом 1,5 ед/мг белка и инкубировали в течение 24 ч. Вторую часть гибридного белка гидролизовали энтерокиназой при тех же условиях и затем проводили рефолдинг. Рекомбинантный пептид выделяли методом ОФ ВЭЖХ в градиенте концентрации ацетонитрила

процедуры рефолдинга гибридного белка и целевого пептида с целью увеличения выхода конечного продукта.

Для получения рекомбинантного магнIFIкамида была использована экспрессионная конструкция на основе плазмиды рЕТ-32b(+) (Novagen, Германия), содержащая нуклеотидную последовательность целевого пептида (UniProtKB-C0HK71), экспрессирующегося в составе гибридного белка совместно с тиоредоксином и гексагистиридиновой последовательностью (6xHis tag) для повышения стабильности и растворимости белка и выделения его методом металл-аффинной хроматографии соответственно. Клетки *Escherichia coli* штамма SHuffle®, в генной инженерии используемого для выделения белков с дисульфидными связями, путем электропорации трансформировали плазмидой рЕТ-32b(+)-magnificamide, после чего осуществляли селекцию трансформированных клеток на чаш-

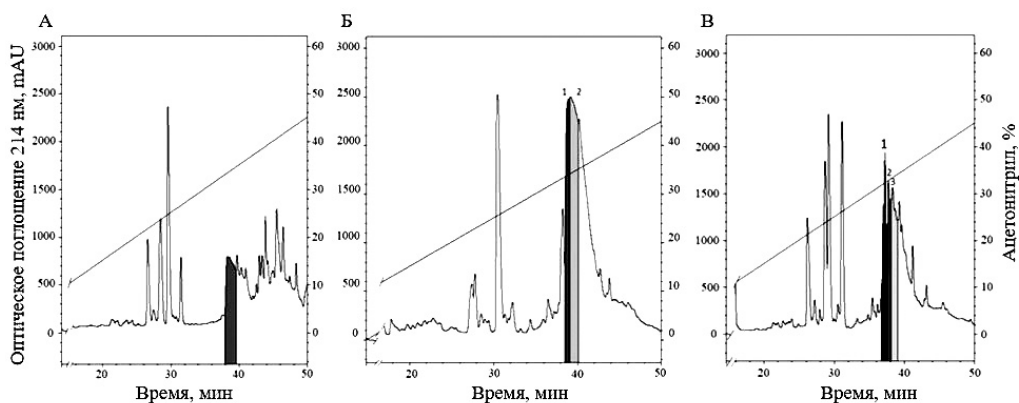


Рис. 2. Профили элюции компонентов реакционной смеси после ферментативного гидролиза гибридного белка энтерокиназой: без проведения рефолдинга (А); проведение рефолдинга после гидролиза (Б); проведение рефолдинга до гидролиза (В). Молекулярная масса пептида фракции 1 соответствует молекулярной массе магнификамида, массы пептидов фракций 2 и 3 отличаются от массы целевого пептида

0–70 %, концентрировали и лиофильно высушивали. Наиболее симметричный пик, соответствующий магнификамиду, в профилях элюции реакционной смеси наблюдали в случае проведения процедуры рефолдинга до гидролиза гибридного белка энтерокиназой (рис. 2), что говорит о приобретении большей частью молекул одинаковой пространственной конформации.

Молекулярные массы полученных пептидов, определенные методом МАЛДИ масс-спектрометрии, составили 4769 Да (рис. 3), что соответствует расчетной молекулярной массе магнификамида. Целевые пептиды обладали биологической активностью: они эффективно ингибировали свиную панкреатическую амилазу (РРА) с константой ингибирования 0,18 нМ, что соответствует значению, полученному ранее для рекомбинантного магнификамида [4]. В результате с 1 л клеточной культуры было получено 4,6 мг рекомбинантного магнификамида при условии

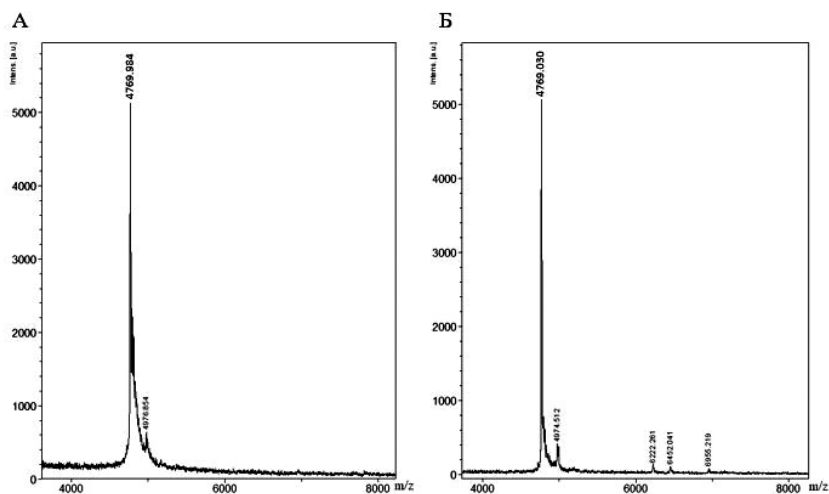


Рис. 3. Масс-спектры выделенных ОФ ВЭЖХ пептидов, полученных без процедуры рефолдинга (А) и с проведением рефолдинга до гидролиза гибридного белка (Б)

проведения рефолдинга после гидролиза гибридного белка и 5,8 мг/л клеточной культуры при проведении рефолдинга до гидролиза.

Эксперимент по выделению пептида с проведением процедуры рефолдинга до гидролиза был проведен еще дважды. Суммируя данные трех экспериментов, с 1 л клеточной культуры было получено 5,8; 6,4 и 6 мг магнификамида, что в среднем составляет  $6 \pm 0,25$  мг.

Таким образом, включение процедуры рефолдинга до проведения гидролиза связанных с тиоредоксином белков, содержащих несколько дисульфидных связей, позволило увеличить выход целевого пептида приблизительно в 1,5 раза по сравнению с ранее используемой стандартной схемой получения рекомбинантного магнификамида, которая позволяла получать около 4 мг/л клеточной культуры [4].

#### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Jouiaei M., Yanagihara A., Madio B., Nevalainen T., Alewood P., Fry B. Ancient venom systems: a review on cnidaria toxins // *Toxins*. 2015. Vol. 7, N 6. P. 2251–2271. DOI: 10.3390/toxins7062251.
2. Tysoe C., Williams L., Keyzers R., Nguyen N., Tarling C., Wicki J., Goddard-Borger E., Aguda A., Perry S., Foster L., Andersen R., Brayer G., Withers S. Potent human  $\alpha$ -amylase inhibition by the  $\beta$ -defensin-like protein helianthamide // *ACS Cent. Sci.* 2016. Vol. 2. P. 154–161. DOI: 10.1021/acscentsci.5b00399.
3. Luo X., Wu J., Jing S., Yan, L.-J. Hyperglycemic stress and carbon stress in diabetic glucotoxicity // *Aging and Disease*. 2016. Vol. 7, N 1. P. 90–110. DOI: 10.14336/AD.2015.0702.
4. Sintsova O., Gladkikh I., Kalinovskii A., Zelepuga E., Monastyrnaya M., Kim N., Shevchenko L., Peigneur S., Tytgat J., Kozlovskaya E., Leychenko E. Magnificamide, a  $\beta$ -Defensin-Like peptide from the mucus of the sea anemone *Heteractis magnifica*, is a strong inhibitor of mammalian  $\alpha$ -Amylases // *Mar. Drugs*. 2019. Vol. 17. P. 1–15. DOI: 10.3390/md17100542.
5. Sintsova O., Gladkikh I., Chausova V., Monastyrnaya M., Anastyuk S., Chernikov O., Yurchenko E., Aminin D., Isaeva M., Leychenko E., Kozlovskaya E. Peptide fingerprinting of the sea anemone *Heteractis magnifica* mucus revealed neurotoxins, Kunitz-type proteinase inhibitors and a new  $\beta$ -defensin  $\alpha$ -amylase inhibitor // *Journ. of Proteomics*. 2018. Vol. 173. P. 12–21. DOI: 10.1016/j.jprot.2017.11.019.
6. Logashina Y., Korolkova Y., Maleeva E., Osmakov D., Kozlov S., Andreev Y. Refolding of disulfide containing peptides in fusion with thioredoxin // *Mendelev Communications*. 2020. Vol. 30. P. 214–216. DOI: 10.1016/j.mencom.2020.03.028.

#### REFERENCES

1. Jouiaei M., Yanagihara A., Madio B., Nevalainen T., Alewood P., Fry B. Ancient venom systems: a review on cnidaria Toxins. *Toxins*. 2015;7(6):2251-2271. DOI: 10.3390/toxins7062251.
2. Tysoe C., Williams L., Keyzers R., Nguyen N., Tarling C., Wicki J., Goddard-Borger E., Aguda A., Perry S., Foster L., Andersen R., Brayer G., Withers S. Potent human  $\alpha$ -amylase inhibition by the  $\beta$ -defensin-like protein helianthamide. *ACS Cent. Sci.* 2016;2:154-161. DOI: 10.1021/acscentsci.5b00399.
3. Luo X., Wu J., Jing S., Yan, L.-J. Hyperglycemic stress and carbon stress in diabetic glucotoxicity. *Aging and Disease*. 2016;7(1):90-110. DOI: 10.14336/AD.2015.0702.
4. Sintsova O., Gladkikh I., Kalinovskii A., Zelepuga E., Monastyrnaya M., Kim N., Shevchenko L., Peigneur S., Tytgat J., Kozlovskaya E., Leychenko E. Magnificamide, a  $\beta$ -defensin-like peptide from the mucus of the sea anemone *Heteractis magnifica*, is a strong inhibitor of mammalian  $\alpha$ -Amylases. *Mar. Drugs*. 2019;17:1-15. DOI: 10.3390/md17100542.
5. Sintsova O., Gladkikh I., Chausova V., Monastyrnaya M., Anastyuk S., Chernikov O., Yurchenko E., Aminin D., Isaeva M., Leychenko E., Kozlovskaya E. Peptide fingerprinting of the sea anemone *Heteractis magnifica* mucus revealed neurotoxins, Kunitz-type proteinase inhibitors and a new  $\beta$ -defensin  $\alpha$ -amylase inhibitor. *Journal of Proteomics*. 2018;173:12-21. DOI: 10.1016/j.jprot.2017.11.019.
6. Logashina Y., Korolkova Y., Maleeva E., Osmakov D., Kozlov S., Andreev Y. Refolding of disulfide containing peptides in fusion with thioredoxin. *Mendelev Communications*. 2020;30:214-216. DOI: 10.1016/j.mencom.2020.03.028.