Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук

На правах рукописи

# Калина Римма Сергеевна

# Структура и функциональная активность нейротоксинов и APETx-подобных пептидов актинии *Heteractis crispa*

02.00.10 - Биоорганическая химия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель: д.х.н. Монастырная М.М.

Владивосток - 2021

# Оглавление

Оглавление	2
Список используемых сокращений и обозначений	5
Введение	8
1 Литературный обзор	13
1.1 Потенциал-зависимые натриевые каналы (Na <sub>v</sub> )	14
1.1.1 Пространственная структура и механизм функционирования Nav каналов	
1.2 Соединения, модулирующие активность Nav каналов	
1.2.1 Нейротоксины актиний – активаторы Nav каналов	
1.3 Протон-чувствительные ионные каналы (ASICs)	31
1.3.1 Пространственная структура ASIC каналов и механизм их активации десенси	гтизации
1.4 Соединения, модулирующие активность ASIC каналов	
1.4.1 Токсины пауков	35
1.4.2 Токсины змей	41
1.4.3 Токсины актиний	
2 Материалы и методы	48
2.1 Материалы	
2.2 Оборудование	
2.3 Характеристика объекта исследования	
2.4 Выделение пептидов из актинии <i>H. crispa</i>	49
2.4.1 Получение водно-этанольного экстракта	49
2.4.2 Гидрофобная хроматография	49
2.4.3 Ионообменная хроматография	49
2.4.4 Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография	49
2.5 Macc-спектрометрический анализ	50
2.6 Определение и анализ аминокислотной последовательности	50
2.6.1 Алкилирование	50

2.6.2 Определение N-концевой аминокислотной последовательности	51
2.6.3 Расщепление бромцианом	51
2.6.4 Тандемная масс-спектрометрия	51
2.7 Определение концентрации пептидов по величине оптического поглощения	51
2.8 Получение спектров кругового дихроизма	52
2.9 Гомологичное моделирование	52
2.10 Определение биологической активности	52
2.10.1 Определение трипсинингибирующей активности	52
2.10.2 Определение способности ингибировать активность α-амилазы	53
2.10.3 Определение максимальной нетоксичной дозы	53
2.10.4 Модель кислотоиндуцированной мышечной боли	53
2.11 Электрофизиологические исследования	54
2.11.1 Экспрессия ASIC каналов и измерение ионных токов	54
2.11.2 Экспрессия Nav каналов и измерение ионных токов	54
3 Результаты и обсуждение	56
3.1 Протеомный анализ нейротоксической фракции ядовитого секрета <i>H. crispa</i>	57
3.2 Выделение пептидов <i>H. crispa</i>	63
3.2.1 Выделение АРЕТх-подобных пептидов	63
3.2.2 Выделение и характеристика нейротоксинов <i>H. crispa</i>	65
3.3 Определение аминокислотной последовательности пептидов <i>H. crispa</i>	67
3.3.1 Определение аминокислотной последовательности АРЕТх-подобных пептидов	68
3.3.2 Определение аминокислотной последовательности нейротоксинов	72
3.4 Вторичная структура пептидов <i>H. crispa</i>	74
3.5 In silico анализ пространственных структур пептидов H. crispa	76
3.6 Электрофизиологическое исследование пептидов <i>H. crispa</i>	82
3.6.1 Электрофизиологическое исследование АРЕТх-подобных пептидов	82
3.6.2 Электрофизиологическое исследование нейротоксинов	86
3.7 Определение максимальной нетоксичной дозы пептидов H. crispa и анальгетиче	ской
активности петида Hcr 1b-2	94

Заключение	
Выводы	99
Приложение А	100
Список литературы	102

### Список используемых сокращений и обозначений

В настоящей работе применены следующие обозначения и сокращения

5-HT<sub>3</sub> – (англ. 5-hydroxytryptamine receptor) ионотропный серотониновый рецептор, суперсемейство цис-петлевых лиганд-зависимых ионных каналов, агонист – аденозин 5-гидрокситриптамин (серотонин)

АМРА – (англ. α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor) ионотропный глутаматный рецептор, агонисты – глутамат и α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота

ASIC - (англ. acid sensing ion channel) протон-чувствительный ионный канал

ВАРNА – *N*-бензоил-*D*,*L*-аргинин *n*-нитроанилид

BgNav – потенциал-зависимый натриевый канал таракана Blattella germanica

ВРТІ – (англ. basic pancreatic trypsin inhibitor) бычий панкреатический ингибитор трипсина

Cav – (англ. voltage-gated calcium channels) потенциал-зависимые кальциевые каналы

DEG/ENaC – (англ. degenerin/epithelial sodium channels) суперсемейство дегенерин эпителиальных натриевых каналов

EC<sub>50</sub> – полумаксимальная эффективная концентрация, концентрация лиганда, которая вызывает эффект, равный половине максимально возможного

hERG – (англ. *human ether-ago-go*-related gene) ген, кодирующий белок α-субъединицы потенциал-зависимого калиевого канала, также используется для обозначения белков или ионных каналов, полученных при транскрипции hERG гена

IC<sub>50</sub> – концентрация полумаксимального ингибирования, количество лиганда необходимое для ингибирования биологического процесса на 50%

ICK – (англ. inhibitor cystine knot) «ингибиторный цистиновый узел», структурный мотив молекул токсинов

 $K_V$  – (англ. voltage-gated potassium channels) потенциал-зависимые калиевые каналы

Na<sub>V</sub> - (англ. voltage-gated sodium channel) потенциал-зависимый натриевый канал

n<sub>н</sub> – коэффициент Хилла

NMDA – (англ. N-methyl-D-aspartate receptor) ионотропный глутаматный рецептор, агонисты – глутамат и N-метил-D-аспартат

Р2Х – (англ. purinergic receptor) пуринэргические рецепторы, семейство лиганд-активируемых ионных каналов, агонист – аденозин 5'-трифосфат

PD – (англ. pore domain) пороформирующий домен Nav канала, включающий транмембранные сегменты S5-S6

PDB – (англ. Protein Data Bank) база данных пространственных структур молекул белков

PDB ID – уникальный шифр доступа пространственной структуры каждого белка в базе данных

РРА – свиная панкреатическая α-амилаза

s.d. – (англ. standard deviation) среднеквадратичное отклонение

TRPV – (англ. transient receptor potential vanilloid) ванилоидный рецептор, который является полимодальным детектором многих стимулов

 $V_{0,5 a \kappa \tau}/V_{0,5 u н a \kappa \tau}$  – мембранный потенциал, при котором активация/инактивация  $Na_V$  каналов достигает 50%

VdNa<sub>V</sub> – потенциал-зависимые натриевые каналы паразитического клеща Varroa destructor

VSD – (англ. voltage-sensing domain) потенциал-чувствительный домен Nav канала, включающий транмембранные сегменты S1-S4

а.о. – аминокислотный остаток

ДАС – диссоциация, активируемая соударением, один из методов стимулирования разрывов полипептидной цепи для получения тандемных масс-спектров

ИЭР – ионизация электрораспылением

КД – круговой дихроизм

МАЛДИ МС – масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией

МНТД – максимальная нетоксичная доза

мРНК – матричная РНК

МС/МС - тандемная масс-спектрометрия

ОФ-ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

ПНС – периферическая нервная система

ТМ - трансмембранные сегменты Nav или ASIC каналов

Трис – трис-(гидроксиметил)-аминометан

ЦНС – центральная нервная система

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

Автор глубоко признателен научному руководителю, д.х.н. Монастырной М.М. и к.х.н. Гладких И.Н. за руководство и поддержку на всех этапах выполнения данной работы, а также за помощь в ее оформлении. Автор выражает благодарность за помощь, оказанную при выполнении отдельных этапов работы, следующим сотрудникам ТИБОХ ДВО РАН: к.х.н. Зыковой Т.А., Вожжовой Е.И., к.х.н. Лейченко Е.В., к.ф.-м.н. Зелепуга Е.А., н.с. Кветкиной А.Н., к.х.н. Дмитренку П.С., к.х.н. Анастюку С.Д., к.б.н. Черникову О.В., н.с. Ким Н.Ю., к.б.н. Кривошапко О.Н. и н.с. Климович А.А., сотрудникам Лёвенского католического университета (Бельгия), докторам Титгату Я. и Пеньеру С. а также сотрудникам Института биоорганичекой химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, к.б.н. Кошелеву С.Г. и д.х.н. Козлову С.А. Автор благодарен д.х.н. Козловской Э.П. за полезные рекомендации, сделанные при выполнении и оформлении данной работы.

#### Введение

Актуальность темы исследования. Одним из важнейших направлений современной биоорганической химии является поиск природных биологически активных пептидов, в том числе токсинов, и исследование их взаимодействия с биологическими мишенями. Неуклонно растущий интерес исследователей к изучению структурно-функциональных взаимосвязей токсинов из разнообразных источников привел к возникновению таких научных направлений, как токсинология и веномика. Известно, что многие ядовитые животные, растения и микроорганизмы продуцируют токсины различной химической природы, влияющие на работу потенциал-зависимых натриевых каналов (Nav), активация которых лежит в основе формирования и передачи нервного импульса. Нарушения функционирования Nav ведет к возникновению смертельно опасных патологий, таких как аритмия, сердечная недостаточность, паралич, эпилепсия и др. Низкомолекулярные блокаторы Nav каналов широко применяют в качестве лекарственных препаратов (анальгетики, антиконвульсанты, антидепрессанты и т.д.). Как правило, недостатком их применения являются побочные эффекты, влияющие на работу сердечно-сосудистой, опорно-двигательной или нервной системы. Эта проблема может быть решена с помощью токсинов пептидной природы, продуцируемых пауками, скорпионами и актиниями. Отличительной особенностью этих токсинов по сравнению с другими биологически активными соединениями является их способность избирательно связываться с ионными каналами и модулировать их функциональную активность. Они являются селективными лигандами, которые взаимодействуют с менее консервативной областью канала, потенциалчувствительным доменом.

Токсины обладают рядом свойств, незаменимых для потенциальных фармакологических агентов: устойчивостью к действию протеаз и изменению температуры человеческого тела, способностью обратимо связываться с мишенью и проникать через клеточную мембрану или гематоэнцефалический барьер. Токсины имеют огромный потенциал в качестве молекулярных инструментов исследования структуры, механизма действия, локализации и физиологической роли ионных каналов в норме и при патологии. Отобранные в результате эволюции молекулы токсинов служат идеальной основой для дизайна меток нейрорецепторов и исследования тонкой регуляции работы каналов благодаря своей непревзойденной селективности и низким действующим концентрациям. Еще одной областью практического использования модуляторов Nav является создание на их основе безопасных для млекопитающих пестицидов избирательного действия, обладающих высокой видовой специфичностью.

Фармакологически значимые протон-чувствительные натриевые каналы ASICs (Acid sensing ion channels), вовлеченные в ряд физиологических процессов (обучение, запоминание,

реализация вегетативных рефлексов, развитие состояний тревоги и страха, механо- и хеморецепция, ноцицепция и т.д.), играют ключевую роль в процессе индуцированной ацидозом гибели нейронов в результате гипоксии, ишемии, травм головного мозга или развития нейродегенеративных заболеваний. Несмотря на то, что доклинические испытания токсинов пауков и актиний, ингибирующих ASIC каналы, подтверждают их очевидный терапевтический потенциал, эти препараты не используют в клинической медицине. Частично это связано с недостатком информации о том, как именно корректировка активности ASIC каналов с помощью токсинов влияет на патофизиологические процессы и поведенческие реакции, а также с комплексным характером действия многих лигандов. В связи с этим очевидна актуальность поиска и изучения модулирующей активности новых селективных модуляторов ASICs, которые можно применять в качестве уникальных фармакологических инструментов и основы для разработки новых терапевтических агентов.

Актинии, древнейшие ядовитые животные, являются одним из богатейших, среди исследованных морских и наземных ядовитых организмов, источником разнообразных по структуре токсинов белковой природы. Помимо пороформирующих токсинов и ингибиторов сериновых протеаз семейства Кунитца, модулирующих/ингибирующих TRPV1 рецепторы и потенциал-зависимые K<sub>v</sub> каналы, актинии продуцируют несколько классов токсинов, модулирующих Nav и ASIC каналы. Так, тропическая актиния Heteractis crispa (семейство Stichodactilidae) продуцирует пептиды, относящиеся к двум уникальным структурным классам, аналогов которым нет среди токсинов других организмов: нейротоксины, активирующие Nav, и так называемые APETx-подобные пептиды, способные модулировать K<sub>v</sub>, Na<sub>v</sub> и ASIC каналы. В настояшее время многие аспекты лиганд-рецепторных взаимодействий и биологической активности АРЕТх-подобных пептидов и нейротоксонов актиний остаются неисследованными. Поэтому, изучение структуры новых токсинов *H. crispa* и описание их фармакологических свойств актуально с точки зрения фундаментальной токсинологии и биоорганической химии, а также может способствовать более глубокому пониманию молекулярных механизмов функционирования Nav и ASIC каналов. Представленная работа является частью исследований, посвященных изучению биологически активных пептидов кишечнополостных, проводимых в Лаборатории химии пептидов Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук.

**Цели и задачи.** Целью данной работы являлся поиск, выделение и структурнофункциональное исследование новых биологически активных APETx-подобных пептидов и нейротоксинов структурного типа 2, продуцируемых актинией *Heteractis crispa*.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

9

- 1. Провести протеомный анализ нейротоксической фракции актинии *H. crispa*; определить биологическую активность методами *in vivo* и *in vitro*; выделить индивидуальные пептиды.
- 2. Установить аминокислотные последовательности, физико-химические характеристики, осуществить биоинформатическмй *in silico* анализ пространственной структуры полученных пептидов.
- Провести электрофизиологическое исследование модулирующего действия пептидов в отношении потенциал-зависимых (Nav) и протон-чувствительных (ASICs) натриевых каналов.
- 4. Определить токсичность и анальгетический эффект индивидуальных пептидов на моделях *in vivo*.

Научная новизна. Из водно-этанольного экстракта *H. crispa* выделено три новых представителя APETx-подобных пептидов, модулирующих протон-чувствительные ионные каналы (ASICs). Среди них впервые обнаружены пептиды, ингибирующие одновременно два основных фармакологически значимых подтипа протон-чувствительных натриевых каналов, ASIC1a и ASIC3, а также пептид, оказывающий потенцирующее действие на токи ASIC3. Показано, что один из пептидов вызывает антигипералгезию *in vivo*.

Из водно-этанольного экстракта *H. crispa* выделено три нейротоксина структурного типа 2, один из которых состоит их двух полипептидных цепей, соединенных двумя дисульфидными мостиками. Впервые охарактеризовано действие нейротоксинов данного структурного типа на токи Na<sub>V</sub> каналов девяти подтипов. Показано, что нейротоксины *H. crispa* активируют каналы центральной нервной системы млекопитающих, Na<sub>V</sub>1.1 – Na<sub>V</sub>1.3, Na<sub>V</sub>1.6, и каналы членистоногих, BgNa<sub>V</sub>1 и VdNa<sub>V</sub>1. Установлено, что механизм их действия заключается в ингибировании инактивации за счет снижения чувствительности каналов к увеличению мембранного потенциала.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Охарактеризованные в рамках данной работы APETx-подобные пептиды являются модуляторами ASIC каналов с принципиально новыми свойствами по сравнению с таковыми известных токсинов. Пептиды, ингибирующие одновременно ASIC1a и ASIC3, являются перспективными соединениями для разработки на их основе новых анальгетиков, что подтверждается результатами исследования их токсичности и биологической активности *in vivo*. Нейротоксины типа 2 могут быть использованы в качестве лидерных пептидов для получения новых инсектицидов ввиду высокой эффективности в отношении каналов членистоногих. Нейротоксины и APETx-подобные пептиды *H. crispa* могут найти применение в качестве молекулярных инструментов исследования механизма действия, локализации и физиологической роли Na<sub>v</sub> и ASIC каналов.

Методология и методы исследования. Теоретическую основу исследования составляют работы отечественных и зарубежных авторов, посвященные проблемам выделения и установления структуры природных пептидов-модуляторов ионных каналов, а также изучения механизмов их действия, в частности, в отношении ASICs и Nav каналов. Методологическую основу исследования формируют методы жидкостной хроматографии (гидрофобной, ионообменной, ОФ-ВЭЖХ), масс-спектрометрии, включая тандемную МС, спектроскопии кругового дихроизма, гомологичного моделирования, биохимические методы (деградация по Эдману). Измерение ионных токов через каналы, экспрессированные в мембранах ооцитов лягушки Xenopus laevis, проводили в условиях фиксации мембранного потенциала. Для создания гомологичных моделей 3D структур пептидов и анализа спектров КД использовали програмное обеспечение Chimera 1.11.2, Swiss PDB Viewer 4.10, Discovery Studio Visualyzer, веб-сервер Modeller 9.19 и пакет CDPro соответственно. Результаты были получены на современном оборудовании с использованием стандартизированных методик и расчетных программ и подвергались статистической обработке. Для определения достоверности различий средних значений в двух выборках использовали t-критерий Стьюдента.

#### Выносимые на защиту положения:

- 1. Согласно установленным аминокислотным последовательностям пептидов, выделенных из актинии *H. crispa*, три из них представляют собой новые APETx-подобные пептиды, а три принадлежат нейротоксинам структурного типа 2.
- 2. APETx-подобные пептиды *H. crispa* способны модулировать активность гомомерных ASIC1a и ASIC3 каналов, модулирующая активность (потенцирование/ингибирование) пептидов зависит от субъединичного состава каналов.
- АРЕТх-подобные пептиды, модулирующие ASICs, принципиально различаются распределением молекулярного электростатического потенциала, что определяет их модулирующую активность.
- 4. Пептид Hcr 1b-2 вызывает выраженную антигипералгезию *in vivo* на модели кислотоиндуцированной мышечной боли.
- Нейротоксины структурного типа 2 из *H. crispa* активируют несколько подтипов потенциалзависимых натриевых каналов млекопитающих (Na<sub>v</sub>1.1 – Na<sub>v</sub>1.3, Na<sub>v</sub>1.6) и членистоногих (BgNav1, VdNav1), снижая чувствительность каналов к увеличению мембранного потенциала и ингибируя их инактивацию.

# Апробация результатов и публикации

Результаты исследований были представлены в виде устных и стендовых сообщений на 6-м Международном симпозиуме «Химия и химическое образование» (Владивосток, 2014), Российско-корейской конференции KORUS–2014 (DREAM) (Корея, 2014), VII Российском

11

симпозиуме «Белки и пептиды» (Новосибирск, 2015), Российско-корейской конференции KORUS–2016 (ТЕАМ) (Владивосток, 2016), V Съезде биохимиков России (Сочи-Дагомыс, 2016), VII Международном симпозиуме «Химия и химическое образование» (Владивосток, 2017), 19-м Европейском токсинологическом конгрессе (EU-IST2018) (Ереван, Армения, 2018), опубликованы в ведущих рецензируемых научных журналах (Toxins, Peptides, Biomedical Journal of Scientific & Technical Research, Биология моря).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 18 работ, включая 10 научных статей в изданиях из списка ВАК (6 работ в отечественных рецензируемых научных журналах и 4 в зарубежных журналах) и 8 тезисов в сборниках научных трудов российских и международных конференций.

# 1 Литературный обзор

Актинии (отряд Actiniaria, класс Anthozoa) являются представителями типа стрекающие (Cnidaria), которые известны как древнейшие активно-ядовитые животные [1,2]. В один таксон стрекающих объединяет наличие специализированных стрекательных клеток, содержащих нематоцисты – органеллы, внутри которых заключены ядовитый секрет и свернутая полая нить с острием на конце. В ответ на механическое или химическое раздражение острие молниеносно выстреливает и протыкает мембрану клетки организма-мишени, при этом нить разворачивается и доставляет ядовитое содержимое нематоциста к цели [1,2].

Актинии, называемые также морскими анемонами, являются типичными представителями донных биоценозов Мирового океана [3]. Будучи хищниками, ведущими малоподвижный образ жизни, они используют ядовитый секрет, чтобы убить или парализовать жертву, обороняться от врагов и успешно конкурировать за территорию. Стрекательные клетки актиний локализованы главным образом в щупальцах, а также в тонких нитевидных аконтиях, коротких закругленных акрорагах, расположенных у основания щупалец, и слизистой оболочке, покрывающей тело животного. В процессе эвалюции у актиний не сформировался обособленный ядовитый аппарат, однако состав их яда значительно варьирует в зависимости от того, из какой части тела он был получен [3].

Актинии продуцируют токсины различной химической природы: пурины, полиэфиры, биогенные амины, бетаины, четвертичные аммониевые основания [1]. Однако в силу уникальных свойств (высокая аффинность, селективность, обратимое связывание) наибольший интерес исследователей вызывают соединения белковой природы, которые составляют основную массу токсинов ядовитого секрета. Наиболее исследованы следующие группы биологически активных пептидов и полипептидов актиний: цитолитические пороформирующие токсины – актинопорины и фосфолипазы А2, токсины-модуляторы потенциал-зависимых калиевых и натриевых каналов (K<sub>v</sub> и Na<sub>v</sub>), ингибиторы сериновых протеаз Кунитц-типа (часть из них является полифункциональными пептидами, способными также модулировать активность болевых TRPV1 рецепторов и/или Ку каналов) [1,2,4-6]. Представители двух структурных классов, ингибиторы протеаз Кунитц-типа и актинопорины, кодируются мультигенными семействами и образуют комбинаторные библиотеки, содержащие десятки высоко гомологичных пептидов и полипептидов, действующих на широкий круг молекулярных мишеней (протеазы/ионные каналы и цитоплазматические мембраны эукариот), что позволяет актиниям преодолевать возможную резистентность жертв [7,8]. Характерной особенностью ядовитого секрета актиний является высокое содержание пептидов-модуляторов ионных каналов, в то время как в составе яда других стрекающих, гидр и медуз, преобладают

гидролитические ферменты и цитолизины [3,9,10]. При этом, в отличие от изученных наземных и морских организмов (пчелы, пауки, скорпионы, змеи, моллюски конусы и др.), актинии продуцируют наиболее разнообразные по структуре токсины [11].

Кишечнополостные актинии, как представители древнейшего таксона ядовитых животных, являются одним из важнейших объектов исследования токсинологов. Несмотря на это, пептидные токсины актиний все еще недостаточно охарактеризованы с точки зрения их экологической роли, процессов эволюционной дивергенции, а также перспектив использования в современной биохимии и фармакологии. Из-за ограниченного (по сравнению с токсинами наземных ядовитых организмов) количества информации о функциях и молекулярных механизмах взаимодействия токсинов актиний с биологическими мишенями их возможности в качестве молекулярных инструментов исследования и основы для создания новых селективных лекарственных препаратов зачастую недооценивают.

#### 1.1 Потенциал-зависимые натриевые каналы (Na<sub>V</sub>)

Ионные каналы – это сложноорганизованные трансмембранные белки, формирующие в клеточной мембране поры, через которые происходит избирательная диффузия ионов, обеспечивающая электрическую активность клеток. Потенциал-зависимые натриевые каналы (Na<sub>V</sub>) эукариот генерируют токи, инициирующие фазу нарастания потенциала действия<sup>1</sup> [12]. Более тысячи мутаций Na<sub>V</sub> связано с наследственными смертельно опасными заболеваниями нервной, сердечно-сосудистой и опорно-двигательной систем (эпилепсия, хронический болевой синдром, аритмия, периодические параличи и др.) [13–15].

Хотя для формирования функциональной поры достаточно  $\alpha$ -субъединицы (220–260 кДа, 1800–2000 а.о.) канала, *in vivo* она, как правило, ассоциирована с регуляторными  $\beta$ -субъединицами ( $\beta$ 1– $\beta$ 4, 30–40 кДа, ~200 а.о.) [15,16]. Помимо регуляторных субъединиц специфику свойств Na<sub>v</sub> каналов в различных типах тканей определяют многочисленные посттрансляционные модификации (фосфорилирование, гликозилирование, сульфатирование, пальмитилирование, образование дисульфидных мостиков и т.д.) [16–18], а также взаимодействие с рядом клеточных белков (кальмодулин, убиквитинлигаза Nedd4 и т.д.) [15–17]. Данные факторы влияют на транспорт белков между компартментами клетки, их встраивание в мембрану и параметры натриевых токов, текущих через каналы.

Аминокислотные последовательности пороформирующих α-субъединиц Na<sub>v</sub> имеют от 50 до 90% гомологии друг с другом и составляют единый тип, в котором выделяют девять

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Потенциал действия – электрический импульс, обусловленный изменением ионной проницаемости мембраны; является физиологической основой нервного импульса.

подтипов: Nav1.1 - Nav1.9 каналы человека кодируются генами SCN1A - SCN5A и SCN8A -SCN11A). Каждый подтип Nav может иметь несколько изоформ, которые являются результатом альтернативного сплайсинга. Изоформа канала влияет на его локализацию и характеристики токов [15]. Филогенетический анализ показал, что наиболее близки межу собой подтипы Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3 (экспрессируются в ЦНС) и Nav1.7 (ПНС) (Рисунок 1). Каналы данных высокочувствительны действию тетродотоксина подтипов к (TTX), мощного низкомолекулярного блокатора Nav, выделенного из яда иглобрюха, который является ценным молекулярным инструментом исследования этих каналов. Еще одну группу составляют каналы Nav1.5 (экспрессируются в кардиомиоцитах) и Nav1.8, Nav1.9 (ПНС), устойчивые к действию ТТХ благодаря единичной аминокислотной замене в порообразующем внеклеточном участке. Две дополнительные филогенетически отдаленные группы составляют TTX-чувствительные Nav1.4 (экспрессируются в скелетных мышцах) и Nav1.6 (ЦНС). Они имеют высокую гомологию последовательностей с таковыми Nav1.1 – Nav1.3, Nav1.7, схожие биофизические характеристики и функции. В соответствии с приведенными данными, гены, кодирующие асубъединицы Na<sub>V</sub>, локализованы в четырех разных хромосомах (Рисунок 1) [19,20].



Na<sub>X</sub> – филогенетически близкая Na<sub>v</sub> группа неселективных ионных каналов, которые не являются потенциал-зависимыми. Справа указаны хромосомы человека, в которых обнаружены ортологи соответствующих генов, кодирующих α-субъединицы rNa<sub>v</sub>

Рисунок 1 – Филогенетическое дерево αсубъединиц Na<sub>V</sub>1.1–Na<sub>V</sub>1.9 каналов крысы (rat Na<sub>V</sub>) [19]

#### 1.1.1 Пространственная структура и механизм функционирования Nav каналов

Пороформирующая  $\alpha$ -субъединица эукариотических Na<sub>V</sub> включает четыре гомологичных повтора (I–IV), каждый из которых содержит шесть трансмембранных  $\alpha$ -спиралей (сегменты S1–S6) (Рисунок 2 А-Б). Трансмембранные сегменты S1–S4 каждого повтора образуют потенциал-чувствительный домен (voltage-sensing domain – VSD), а сегменты S5–S6 формируют пору (pore domain – PD). При этом каждый домен VSD сдвинут на шаг относительно соответствующего домена PD по периметру канала (Рисунок 2 В-Г) [12,21,22]. Na<sub>V</sub> каналы прокариот имеют аналогичное строение, но состоят из четырех идентичных полипептидных цепей (сегменты S1–S6), каждая из которых аналогична одному из гомологичных повторов (I–IV) эукариотического канала. Исключительную селективность в

отношении ионов Na<sup>+</sup> обеспечивают аминокислотные остатки так называемых p-петель (линкеры S5–S6, Рисунок 2 A), образующие два селективных «кольца»: внешнее состоит из остатков Glu, Glu, Asp, Asp (EEDD-ring), а внутреннее – из остатков Asp, Glu, Lys, Ala (DEKA-ring) (Рисунок 2 Б-В). Проницаемость канала для ионов Na<sup>+</sup> и низкомолекулярных блокаторов (лекарственные перпараты) регулируется изменением конфрмации боковых цепей остатков сегмента S6 (rNa<sub>v</sub>1.4, Val440, Leu795, Ile1287 и Ile1590 [23]), формирующих внутриклеточный воротный механизм (intracellular activation gate или a-gate, Рисунок 2 Б) [21].



А – Ленточная диаграмма 3D структуры субъединицы бактериального канала Na<sub>v</sub>Ab [12].
Б-В – Канал Na<sub>v</sub>Ab, вид сбоку [21] (Б) и сверху [12] (В). Участки цепи окрашены в соответсвии с выполняемыми функциями. Г – Ленточная диаграмма 3D структуры hNav1.7 канала в комплексе с двумя регуляторными субъединицами β1 и β2. Гомологичные повторы (I – IV) окрашены в разные цвета (здесь и далее), инактивирующий внутриклеточный линкер DIII–DIV окрашен оранжевым, регуляторные β-

субъединицы окрашены в бежевый и светло-коричневый цвета. Остатки сахаров показаны в стержневом представлении (здесь и далее) [24]

Рисунок 2 – Строение Nav канала

В зависимости от величины мембранного потенциала Na<sub>v</sub> каналы находятся в одном из трех основных состояний: закрытом, открытом или инактивированном. Установлено, что Na<sub>v</sub> имеют два независимых воротных механизма, один из которых лежит в основе активации канала, другой – инактивации [21,25,26]. В настоящее время моделью, наиболее полно

отражающей особенности функционирования  $Na_V$  каналов эукариот, является модель асинхронной активации/инактивации (asynchronous gating model) [21,25]. В рамках этой модели для открытия канала достаточно активации потенциал-чувствительных доменов VSDI–VSDIII, в то время как активация VSDIV делает доступным сайт связывания внутриклеточного линкера между повторами III и IV, который блокирует пору (Рисунок 3). Последний процесс занимает 1–2 мс и называется быстрой инактивацией [21]. Установлено, что потенциал-чувствительный домен VSDIV движется в пять раз медленнее, чем остальные VSDs [21], а его активация является достаточным условием инактивации канала и определяет ее скорость [27]. J.J. Lacroix и соавторы определили а.o. сегментов S2 и S4 VSD доменов, контролирующие скорость транслокации и определяющие асинхронность активации [28].



Рисунок 3 – Модель асинхронной активации/инактивации Nav каналов эукариот [21]

Потенциал-зависимая активация  $Na_V$  происходит при деполяризации мембраны<sup>2</sup> на первом этапе формирования потенциала действия. Каждая из четырех трансмембранных спиралей S4 является потенциал-чувствительным сенсором, который содержит от четырех до восьми повторяющихся положительно заряженных остатков (gating charges или R1–R4), перемежающихся парами гидрофобных остатков [21,29] (Рисунок 4). Положительно заряженные остатки, погруженные в гиперполяризованную мембрану (отрицательный заряд на внутриклеточной стороне мембраны), при ее деполяризации движутся «наружу» в электрическом поле мембраны, приводя к транслокации каждого сегмента S4 [16,29]. При этом не менее трех остатков Arg (R1–R4) взаимодействует с высоко консервативными объемными гидрофобными остатками, Ile33 (сегмент S1), Phe67 (S2) и Ile96 (S3), которые образуют эффективный барьер для ионов и молекул воды (hydrophobic constriction site – HCS) [29]

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Деполяризация – процесс снижения разности потенциалов между внутренней и наружной поверхностями клеточной мембраны в ответ на механические, химические или электрические стимулы. В результате деполяризации внутриклеточная сторона мембраны приобретает положительный заряд, в то время как в состоянии покоя внутриклеточная сторона мембраны заряжена отрицательно.

(Рисунок 4). Остатки R1–R4 инактивированного VSD формируют сеть ионных и водородных связей с консервативными полярными или отрицательно заряженными остатками кластера INC (intracellular negative cluster) на внутриклеточной стороне спиралей S2 и S3. По мере достижения состояния активации остатки R1–R4 начинают взаимодействовать с кластером ENC (extracellular negative cluster) на внеклеточной стороне VSD [21,29,30] (Рисунок 4). В целом активация сегментов S4 доменов VSDI–VSDIII является необходимым и достаточным условием открытия поры в области внутриклеточного воротного механизма (a-gate), в то время как движение S4 домена VSDIV инициирует процесс инактивации канала [21,27].

Одной из особенностей эукариотических  $Na_V$  и  $Ca_V$  каналов, отличающих их от  $K_V$  или бактериальных  $Na_V$  каналов, является быстрая инактивация, которая происходит при единичном импульсе деполяризации. Быструю инактивацию обеспечивает наличие внутриклеточного линкера между III и IV повторами (около 53 а.о.), включающего консервативный мотив из трех гидрофобных а.о. (IFM-мотив) [21,29].



Показаны остатки Arg (R1-R4), последовательно меняющие свое положение относительно сайта HCS, движущиеся от кластера INC в направлении кластера ENC в процессе активации VSD [29]

Рисунок 4 – Ленточные диаграммы моделей 3D структуры потенциал-чувствительного домена (VSD) бактериального канала NaChBac

Механизм работы инактивационных ворот отражает название «откидная крышка» («hinged-lid») [21] (Рисунок 3). IFM-мотив является гидрофобной «задвижкой» для линкера DIII–DIV, который служит «крышкой» и перемещается за счет «шарниров», предположительно, консервативных остатков Pro и Gly [16,21,30,31]. Скорость быстрой инактивации лимитируется активацией домена VSDIV, которая делает доступным сайт связывания внутриклеточного линкера DIII–DIV. Он механически блокирует пору, и ток исчезает, несмотря на то, что пора остается открытой с внутренней стороны (a-gate) [21,25–27].

При продолжительной (60–90 с) и глубокой деполяризации или повторяющихся импульсах потенциала действия наступает медленная (от нескольких секунд до минуты) инактивация Na<sub>V</sub> каналов [29]. В отличие от быстрой инактивации она носит потенциалзависимый характер. Большая часть мутаций, влияющих на медленную инактивацию, локализована в пороформирующем регионе каждого из четырех повторов (р-петли и селективный фильтр). Движение сегмента S4 может снижать аффинность линкера DIII–DIV, вызывая его диссоциацию. Затем происходят конформационные изменения внеклеточного участка поры и селективного фильтра, приводящие к инактивации канала [21,29–32].

На протяжении десятилетий Nav каналы как основа функционирования нервной системы являются предметом неослабевающего интереса исследователей. Еще в 1963 г. за разработку математической модели, описывающей возникновение и распространение потенциалов действия и роль натриевых каналов в их формировании, А. Hodgkin и A. Huxley получили Нобелевскую премию в области физиологии и медицины [33]. В последние годы была решена исключительно сложная задача – методами криоэлектронной микроскопии удалось получить пространственные структуры комплексов Nav каналов млекопитающих с несколькими токсинами-модуляторами [24]. В настоящее время активно продолжаются многочисленные особенностей исследования структурно-функциональных взаимосвязей Nav И ИХ функционирования в живом организме.

#### 1.2 Соединения, модулирующие активность Nav каналов

Натриевые каналы играют ключевую роль в передаче электрических сигналов. Многие природные соединения, влияющие на их активность, являются мощными токсинами. В фармакологии низкомолекулярные блокаторы Na<sub>v</sub> используют в качестве медицинских препаратов (обезболивающих, противоаритмических, противоэпилептических, антидепрессантов и др.) [13,21,34].

Известно, что лиганды Nav связываются с пороформирующей  $\alpha$ -субъединицей канала. На сегодняшний день идентифицировано восемь сайтов связывания лигандов-модуляторов (Рисунок 5) [25]. Сайт 1 представляет собой четыре р-петли, формирующие селективный фильтр Nav канала (Рисунок 5). С ним взаимодействуют такие хорошо известные токсины, как TTX и сакситоксин (STX), впервые обнаруженные в рыбах семейства Tetraodontidae и моллюсках рода Saxidomus соответственно, а также µ-конотоксины, продуцируемые моллюсками рода Conus. Связывание лигандов с сайтом 1 механически блокирует транспорт ионов сквозь пору Nav (Рисунок 6 A) [35]. Многие годы TTX и STX применяют в качестве молекулярных инструментов исследования Nav. Сайт их связывания является наиболее изученным, а чувствительность различных подтипов Nav к TTX до сих пор используется для классификации каналов. TTX – один из самых высокоактивных природных токсинов [14,21,33], что обусловлено комплементарностью геометрии молекулы TTX (Рисунок 5 Б) и структуры селективного фильтра Nav канала [14,19,36,37].

µ-Конотоксины представляют собой короткие пептиды (16–26 а.о.) с тремя дисульфидными связями. В то время как молекулы ТТХ и STX способны связаться с

19

внутренней частью селективного фильтра (DEKA-ring), более объемные сильно основные µконотоксины взаимодействуют с отрицательно заряженными остатками внешнего устья поры [33,38,39]. Поэтому, в отличие от TTX, µ-конотоксины не блокируют ток полностью. Одним из последних успехов в изучении молекулярного механизма действия µ-конотоксинов стало определение 3D структуры комплекса канала hNa<sub>v</sub>1.2 с токсином KIIIA, позволившее объяснить селективность последнего [39].



A – Схема строения пороформирующей α-субъединицы, сайты связывания окрашены в разные цвета.
Б – Ленточная диаграмма 3D структуры hNav1.4 канала (VSDI и VSDIII не показаны) и сайты
связывания молекул лигандов (показаны молекулярные поверхности). Селективный фильтр (DEKA-ring) показан прямоугольником. Приведены структуры молекул тетродотоксина (TTX), батрахотоксина (BTX), лидокаина и пиретрина I

Рисунок 5 – Сайты связывания лигандов-модуляторов Nav каналов [25]

Сайт 2 – это регион, с которым связываются небольшие липофильные молекулыактиваторы различной химической природы (батрахотоксин – ВТХ, вератридин, аконитин, граянотоксин), обнаруженные в растениях, животных и бактериях [33,40]. Они взаимодействуют преимущественно с каналами в открытом состоянии, не проявляют заметной селективности в отношении конкретных подтипов Na<sub>v</sub> и связываются с аминокислотными остатками на внутриклеточной стороне пороформирующих трансмембранных сегментов S6 доменов DI и DIV (Рисунок 5). Алкалоиды замедляют или ингибируют инактивацию Na<sub>v</sub>, снижают их проводимость и селективность, а также смещают кривую активации в направлении отрицательных значений мембранного потенциала, активируя каналы при потенциале покоя [25,33]. ВTX – известный алкалоид (Рисунок 5 Б), аккумулирующийся лягушками-листолазами *Phyllobates* spp., является сильнейшим токсином, вызывающим аритмию, угнетение дыхания и конвульсии. Его низкая селективность связана с высокой консервативностью остатков четырех сегментов S6 каналов Na<sub>v</sub>1.1 – Na<sub>v</sub>1.8, с которыми взаимодействует молекула тоскина [33,40]. Предполагается, что молекула BTX препятствует сужению поры и позволяет ионам Na<sup>+</sup> проникнуть в клетку [21].



Рисунок 6 – Схематическая диаграмма, иллюститрующая механизм действия некоторых токсинов и их влияние на токи Na<sub>v</sub> каналов, [35] (А-Д) и структура молекул полиэфиров, бреветоксина PbTx-1 (R = CH<sub>2</sub>C(=CH<sub>2</sub>)CHO) и сигуатоксина C-CTX-1 (E)

Считается, что сайт 3 локализован в пределах внеклеточного линкера, соединяющего трансмембранные сегменты S3 и S4 домена DIV (Рисунок 5). Взаимодействуют с сайтом 3 αтоксины скорпионов, δ-токсины пауков и токсины актиний. Наибольшую аффинность они проявляют к каналам, находящимся в закрытом состоянии. Блокируя конформационные изменения, происходящие при быстрой инактивации Na<sub>v</sub>, эти лиганды позволяют каналу долгое время оставаться открытым [25] (Рисунок 6 Б). α-Токсины скорпионов содержат 60–80 а.о. и стабилизированы четырьмя дисульфидными связями. Предполагается, что фолд молекулы токсина – трехтяжевый β-лист и α-спираль, обеспечивает ему способность связываться с Na<sub>V</sub>. Менее консервативные петли и С-концевой фрагмент определяют специфичность в отношении каналов млекопитающих или насекомых [41]. В результате активации потенциалчувствительного домена VSDIV его конформация существенно меняется, поэтому при деполяризации мембраны аффинность токсинов, связывающихся с сайтом 3, снижается [42].

Согласно пространственной структуре коплекса химерного канала hNav1.7-NavPas с  $\alpha$ -токсином скорпиона AaH2, замедляющим инактивацию Nav, молекула AaH2 локализована в полости между VSDIV и PDI и образует обширную сеть связей, в том числе и с консервативным углеводным остатком (PDI, гликозилированный а.о. Asn) (Рисунок 7 A) [42]. С-концевые основные остатки AaH2 (Arg62 и His64), взаимодействующие с PDI, позволяют токсину надежно связываться с каналом. При этом фрагмент Ala39-Ser40-Pro41-Tyr42 ( $\beta$ 2- $\beta$ 3) и C-концевой Gly59 токсина контактируют с линкером S1–S2, а характерная для инактивированного VSDIV конформация линкера S3–S4 поддерживается благодаря связям между остатками токсина AaH2 (Thr13, Asn44, Arg62, Cys63) и линкера S3–S4 канала (Phe1583, Asp1586, Glu1589). Кроме того, при условии активации VSDIV остаток R1 сегмента S4 занимает то же положение, что и остаток Arg62 (AaH2) в комплексе с инактивированным VSDIV. Следовательно, образование комплекса с токсином AaH2 создает значительные



А – Комплекс hNa<sub>v</sub>1.7-Na<sub>v</sub>Pas канала с токсином AaH2. Показаны VSDIV и PDI канала, молекулярная поверхность AaH2, боковые цепи Arg62 и His64 токсина и углеводный остаток PDI (стержневая модель)
[42]. Б – Комплекс Na<sub>v</sub>Pas канала с β-токсином Dc1a; показаны дисульфидные мостики молекулы Dc1a и молекула TTX (шаро-стержневая модель) [43]

Рисунок 7 – Ленточные диаграммы 3D структур комплексов токсинов с сайтом 3 [42] и сайтом 4 [43] Nav каналов

стерические препятствия для изменения конформации линкера S3–S4 и транслокации сегмента S4, которые необходимы для инактивации Nav канала [42].

Сайт 4 включает внеклеточные линкеры S1-S2 и S3-S4 домена VSDII (Рисунок 5) и является мишенью для β-токсинов скорпионов и пауков [33,40]. Подобно α-токсинам скорпионов, β-токсины являются активаторами Nav каналов, но вместо ингибрования инактивации они смещают кривую активации в направлении отрицательных значений мембранного потенциала, делая канал более чувствительным к деполяризации мембраны [33,40]. Хотя детали молекулярного механизма действия β-токсинов пока неизвестны, предполагается, что их молекулы связываются с сайтом 4 инактивированного домена VSDII, который в процессе активации претерпевает конформационные изменения, что позволяет токсинам прочнее связаться с каналом и зафиксировать VSDII в активированном состоянии [33,40] (Рисунок 6 В). Согласно результатам структурно-функциональных исследований, особую роль в стабилизации активированного VSDII играет консервативный остаток βтоксинов скорпионов – Glu15. Подобно α-токсинам, β-токсины скорпионов содержат вариабельные регионы, петли и С-конец, определяющие их способность активировать Nav каналы млекопитающих или насекомых [44]. Установлено, что в образование комплеса Na<sub>V</sub> с βтоксинами скорпионов вовлечены, помимо VSDII, некоторые остатки PDI или PDIII [33,40]. Пространственная структура комплекса канала насекомого NavPaS (Periplaneta americana) с токсином паука Dc1a (Diguetia canities) в присутствии TTX или STX подтверждает, что молекула токсина формирует обширную сеть полярных и гидрофобных взаимодействий с положительно заряженными остатками потенциал-чувствительного сегмета S4, линкером S1-S2 VSDII и сегметом S5 PDIII (Рисунок 7 Б). Это стабилизирует VSDII в активированном состоянии и способствует открытию Nav канала [43].

Сайт 5, исследованный заметно меньше сайтов 1–4, включает, предположительно, сегменты S6 DI, S5 DIV и линкер S5–S6 PDIV (Рисунок 5). Взаимодействуют с сайтом 5 активаторы Na<sub>V</sub> канала – бреветоксины (PbTx) и сигуатоксины (CTX), продуцируемые динофитовыми водорослями *Karenia brevis* и *Gambierdiscus toxicus* [25,33] (Рисунок 6 Е). Воздействие PbTx и CTX является причиной отравления морскими организмами, аккумулирующими токсины, что вызывает характерные симптомы: тошноту, парестезию лица и конечностей, паралич, судороги и т.д. [38,40]. Связываясь с Na<sub>V</sub>, полиэфиры PbTx и CTX смещают кривую активацию Na<sub>V</sub>, повышая вероятность открытия канала и увеличивая время, в течение которого канал способен проводить ток. Липофильные молекулы токсинов PbTx и CTX встраиваются в мембрану в конфигурации «хвост вверх, голова вниз» параллельно трансмембранным сегментам канала и характеризуются наибольшей аффинностью к каналам в

открытом состоянии [25,33]. Полагают, что молекула PbTx связывается с каналом благодаря жесткой системе колец G-J (Рисунок 6 Е), в то время как лактон кольца A участвует в изменении кинетики инактивации канала и стабилизирует открытое состояние Na<sub>v</sub>. Несмотря на то, что PbTx и CTX связываются с сайтом 5, они оказывают противоположные эффекты на амплитуду токов Na<sub>v</sub>; следовательно, механизмы действия токсинов могут различаться [33].

Среди всех сайтов связывания Na<sub>v</sub> сайт 6 остается одним из наименее исследованных. Наиболее известные  $\delta$ -конотоксины, взаимодействующие с сайтом 6, представляют собой небольшие пептиды (26–32 а.о.), отличающиеся высоким содержанием консервативных гидрофобных остатков, экспонированных на поверхности молекулы. Предполагается, что эти остатки важны для образования комплекса с Na<sub>v</sub> [25,33,38]. Установлено, что  $\delta$ -конотоксин SVIE (*Conus striatus*) взаимодействует с триадой гидрофобных остатков линкера S3–S4 домена DIV (rNa<sub>v</sub>1.4, Tyr1433-Phe1434-Val1435) [40]. Структурно-функциональные исследования в сочетании с экспериментами *in silico* позволили создать модель комплекса  $\delta$ -конотоксина EVIA (*Conus ermineus*) с mNa<sub>v</sub>1.7 и rNa<sub>v</sub>1.4 каналами. Молекула  $\delta$ -EVIA взаимодействует с VSDIV и сегментом S5 PDI (Pucyнок 8 A) [45], фиксируя потенциал-чувствительный сегмент S4 VSDIV в состоянии активации. Несмотря на то, что сайты 3 и 6 расположены в пределах линкера S3–S4 домена VSDIV,  $\alpha$ -токсины скорпионов и  $\delta$ -конотоксины не конкурируют за связывание с Na<sub>v</sub>



A – Комплекс mNa<sub>v</sub>1.7 канала с δ-конотоксином EVIA (трубчатая диаграмма). Показан домен VSDIV канала, желтыми пунктирными линиями обозначенны водородные связи [45].
Б – Структура ДДТ и комплекс канала комара (*Aedes aegypti*) AaNa<sub>v</sub>1-1 с двумя молекулами ДДТ (шаровая модель). Показаны сегменты канала S5, S6, внутриклеточный линкер S4–S5 и сайты связывания ДДТ – РуR1 и РуR2 [46]

Рисунок 8 – Ленточные диаграммы моделей 3D структур комплексов токсинов с сайтом 6 [45] и сайтом 7 [46] Nav каналов

каналом. Кроме того, связывание δ-конотоксинов не зависит от значения мембранного потенциала, что характерно для α-токсинов и токсинов актиний. δ-Конотоксины смещают кривую активации в направлении отрицательных значений мембранного потенциала, ингибируют инактивацию канала и снижают ее скорость [25,33,35,38,40] (Рисунок 6 Б).

С сайтом 7 связываются пиретроиды – синтетические аналоги природных инсектицидов растений, и хлорорганическое соединение дихлордифенилтрихлорметилметан (ДДТ) [25] (Рисунок 5 и 8 Б). Несколько десятков пиретроидов, а также ДДТ нашли практическое применение в качестве высокоактивных инсектицидов [47]. Эти соединения подавляют инактивацию Na<sub>V</sub>, позволяя каналам дольше оставаться в открытом состоянии, что вызывает деполяризацию мембран клеток и блокирует проведение нервных импульсов. Показано, что пиретроиды, по крайней мере некоторые из них, связываются преимущественно с открытыми Na<sub>V</sub> каналами. Установлено, что молекулы пиретроидов имеют два аналогичных (но не идентичных) сайта связывания – PyR1 и PyR2 (Рисунок 8 Б), образованных гидрофобными остатками спиралей S5–S6 и внутриклеточного линкера S4–S5 доменов DI и DII [46,47].

Между селективным фильтром и внутриклеточным воротным механизмом (a-gate) в центральной полости поры Nav расположен сайт связывания местных анестетиков (Сайт 8), который включает остатки трансмембранных спиралей S6 доменов DI, DIII и DIV (Рисунок 5). Он является мишенью множества лекарственных соединений, блокирующих Nav (лидокаин, мексилетин, фенитоин, карбамазепин и др.) [13,25]. Все эти лиганды объединяет наличие липофильного ароматического кольца и гидрофильных аминогрупп. Сайт 8 сформирован ароматическими и гидрофобными остатками. Показано, что наибольший вклад в связывание местных анестетиков вносят высоко консервативные остатки Туг и Phe (S6 DIV), взаимодействующие с гидрофобным фрагментом и аминогруппами молекул блокаторов соответственно [48]. Из-за высокой консервативности остатков, формирующих сайт 8, лиганды, связывающиеся с ним, неселективны. Аффинность связывания зависит от состояния Nav (закрыт < открыт < инактивирован); кроме того, инактивация канала блокирует доступ лиганда к сайту связывания (закрытый Nav) или «запирает» небольшие молекулы внутри поры канала (инактивированный Na<sub>v</sub>). Альтернативным путем, доступным для липофильных соединений, являются боковые ответвления поры (fenestration), позволяющие блокировать закрытые или инактивированные Nav [33,48].

В настоящее время вопрос о количестве и локализации сайтов связывания на поверхности Na<sub>v</sub> каналов, так же, как и о молекулярных механизмах взаимодействия с ними множества токсинов, остается открытым. Например, уникальный эффект оказывают µО-конотоксины, блокируя домены VSDs в состоянии инактивации и предотваращая таким образом открытие каналов (Рисунок 6 Д). Сайт связывания µО-конотоксинов,

предположительно, частично перекрывается с сайтом 4 [33,35,38]. Установлено также, что токсины пауков, HWTX-IV (*Cyriopagopus schmidti*) и ProTx-II (*Thrixopelma pruriens*), связываясь с линкером S3–S4 VSDII (Сайт 4), ингибируют активацию Na<sub>V</sub>, сдвигая кривую активации в направлении положительных значений мембранного потенциала [24,33,35] (Рисунок 6 Г). Это указывает на сложный характер взаимосвязей между сайтом связывания токсина и теми эффектами, которые он оказывает на процессы активации/инактивации, а также на возможность дополнительных контактов за пределами классических сайтов связывания [33,40].

## 1.2.1 Нейротоксины актиний – активаторы Nav каналов

Среди многообразия токсинов белковой природы, которые продуцируют актинии, наибольшую опасность для рыб, членистоногих и млекопитающих представляют нейротоксины – пептиды, активирующие Na<sub>v</sub> каналы. Именно нейротоксины, входящие в состав ядовитого секрета актиний, обладают выраженной нейро- и кардиотоксичностью [49,50]. Возможно, поэтому они являются превалирующими компонентами яда и стали первыми токсинами актиний, первичная структура которых была установлена еще в 70-х годах прошлого века [1,4]. На сегодняшний день в геномах/протеомах ядовитых наземных и морских животных не обнаружено токсинов, модулирующих Na<sub>v</sub>, которые были бы гомологичны нейротоксинам актиний, образующих несколько уникальных структурных классов [51].

Интересно, что большинство структурных классов токсинов актиний, включая токсинымодуляторы Na<sub>v</sub>, остается достаточно консервативным на протяжении 600 млн лет благодаря действию очищающего отбора [52]. Это резко контрастирует с эволюционными процессами в более молодых линиях, таких как морские моллюски конусы, змеи и скорпионы, гены которых в значительно большей степени подвержены диверсифицирующему отбору [51]. Среди токсинов актиний влиянию положительного отбора подвержены, в основном, остатки, расположенные на поверхности молекул. Так, токсины-модуляторы Na<sub>v</sub> (типы 1 и 2) и токсины  $K_v$  (тип 3) имеют общее эволюционное происхождение, а их различные фармакологические свойства являются результатом быстрой адаптивной эволюции [52].

Еще одной особенностью актиний является использование ими стратегии согласованной эволюции [51,53]. Так, анализ нуклеотидных последовательностей генов актиний *Nematostella vectensis, Anemonia viridis* и *Actinia equina*, кодирующих нейротоксины, показал их удивительно высокую консервативность в пределах каждого вида, которая является результатом согласованной эволюции и направлена на повышение уровня экспрессии генов. В то же время установлено, что часть кодирующих нейротоксины генов *A. viridis* и *A. equina*, напротив, эволюционировала в ходе диверсифицирующего отбора (положительный дарвиновский отбор),

способствующего гетерогенности близкородственных генов и появлению новых функций у кодируемых ими токсинов [51,53].

Все известные нейротоксины актиний (более 60 пептидов) разделют на четыре структурных типа на основании гомологии их аминокислотных последовательностей и топологии дисульфидных связей (Рисунок 9) [51]. К настоящему времени в виде индивидуальных пептидов выделено около 40 нейротоксинов структурного типа 1 и только 14 представителей типа 2 (Приложение A1, A2), пять нейротоксинов типа 3 и два токсина типа 4. Более двух десятков функционально активных нейротоксинов, структура которых была установлена на основании кДНК, получено путем гетерогенной экспрессии. Большинство нейротоксинов структурного типа 1 было обнаружено в актиниях семейства Actiniidae, в то время как представители семейства Stichodactylidae продуцируют нейротоксины типов 1 и 2 [1,51].



На темно-сером фоне показаны идентичные аминокислотные остатки, на светло-сером – подобные; сверху приведена схема расположения дисульфидных мостиков; выравнивание выполнено с помощью программы Vector NTI (здесь и далее)

Рисунок 9 – Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей нейротоксинов актиний – активаторов Nav каналов

Нейротоксины структурных типов 1 и 2 состоят из 46-49 а.о. (за исключением нейротоксинов *A. equina*, включающих 54 а.о., Рисунок А1) и содержат шесть консервативных

остатков цистеина, образующих 3 дисульфидных мостика (C1-C5, C2-C4, C3-C6). Для них характерно наличие двух (тип 1) или четырех (тип 2) основных остатков на C-конце. Аминокислотные последовательности нейротоксинов типов 1 и 2 имеют до 50% гомологии и потому рассматриваются как эволюционировавшие от одного гена предшественника. Однако результаты оценки перекрестной реактивности антигенов свидетельствуют об отсутствии антигенного сходства между ними [1,4,38,49]. Также обнаружено два нейротоксина, халькурин (*Halkurias* sp.) и Nv1 (*N. vectensis*) [1,53], аминокислотные последовательности которых обладают структурными особенностями, характерными для пептидов, принадлежащих обоим типам (Рисунок 9). Так, халькурин, с одной стороны, содержит консервативные остатки нейротоксинов типа 1, а с другой отличается высокой степенью гомологии (49–74%) с нейротоксинами типа 2.

Пространственные структуры нескольких нейротоксинов типа 1 (ApA и ApB из Anthopleura xanthogrammica, ATX-I из Anemonia sulcata, CgNa из Condylactis gigantea) и токсина Sh1 (Stichodactyla helianthus), принадлежащего к типу 2, были установлены с помощью спекторскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) [4,11]. Они представляют собой так называемый β-дифензин-подобный фолд – скрученный антипараллельный четырехтяжевый β-лист, стабилизированный тремя дисульфидными связями (Рисунок 10 A, Б). Тяжи 1 и 2 соединяет протяженная и конформационно подвижная так называемая Arg-петля (Sh1, a.o. 7–16), предположительно, обеспечивающая аффинность связывания нейротоксина с сайтом 3 натриевого канала и селективность по отношению к различным подтипам Na<sub>v</sub> [4,38,51].



Боковые цепи функционально важных остатков (стержневая модель) окрашены в соответствии с природой радикала: розовый – ароматические, зеленый – алифатические, оранжевый – полярные, синий – положительно заряженные и красный – отрицательно заряженные

Рисунок 10 – Ленточные диаграммы 3D структур нейротоксинов АТХ-II (А), АрВ (Б) и АТХ-III (В), принадлежащих структурным типам 1 и 3 соответственно [51]

Число известных нейротоксинов актиний, принадлежащих структурным типам 3 и 4 (Рисунок 9) значительно ниже, чем нейротоксинов типов 1 и 2. Тип 3 включает пять коротких пептидов, состоящих из 27-32 а.о. Четыре гомологичных токсина, PaTX (31 а.о.) из *Entacmaea actinostoloides*, Da I и Da II (30 а.о.) из *Dofleinia armata* и Er-1 из *Entacmaea ramsayi* (32 а.о.), имеют общую схему локализации четырех дисульфидных мостиков (Рисунок 9). Однако пептид ATX-III (27 а.о.), выделенный из *A. viridis*, который также относят к этому типу, содержит три дисульфидных мостика и не имеет общих структурных мотивов с другими токсинами данного типа [1,54]. Расположение функционально важных а.о. Arg1, Pro5, Tyr7, Trp8, Pro12, Trp13 и Tyr18 на поверхности молекулы (Рисунок 10 В) еще больше подчеркивает различие в структуре и свойствах ATX-III и других нейротоксинов структурного типа 3 [4,55].

Нейротоксины структурного типа 4 – калитоксины I и II (46 a.o.) из *Calliactis parasitica*, сравнимы с нейротоксинами типов 1 и 2 по длине полипептидной цепи и топологии дисульфидных связей, но выделяются в отдельный тип из-за низкой гомологии их аминокислотных последовательностей с нейротоксинами типов 1 и 2 (Рисунок 9) [1].

На сегодняшний день лишь несколько нейротоксинов типа 1 (ATX-II из A. sulcata, ATF-II из Anthopleura fuscoviridis, CgNa, Bc-III Bunodosoma caissarum, CGTX-II Bunodosoma cangicum) было охарактеризовано с точки зрения их активности и селективности в отношении Na<sub>v</sub>1.1 – Na<sub>v</sub>1.7 каналов млекопитающих [35]. Ни один из нейротоксинов структурного типа 2 не был исследован с применением этого подхода. Очевидно, одни нейротоксины актиний отличаются высокой токсичностью в отношении каналов млекопитающих (АрА и АрВ), другие являются мощными инсектотоксинами (ATX-I и ATX-III из A. sulcata), а некоторые действуют на все виды каналов (ATX-II) [51,56]. До сих пор ведутся поиски токсинов, действующих избирательно на каналы насекомых. В этом отношении сейчас лидируют ATX-I и Nv1 [51]. Учитывая, что множество нейротоксинов актиний все же обладает большей активностью в отношении каналов насекомых, их можно рассматривать в качестве богатейшего источника Дополнительным преимуществом новых инсектицидов. модулирующего действия нейротоксинов актиний на Nav каналы насекомых является практически полное отсутствие инактивации канала после аппликации токсина, что не характерно для каналов млекопитающих [56].

Нейротоксины актиний связываются с сайтом 3 Na<sub>v</sub> канала, который расположен в пределах внеклеточного линкера S3–S4 домена DIV, что отсрочивает инактивацию, делает ее неполной и/или замедляет кинетику процесса, что позволяет каналам дольше оставаться в открытом состоянии и увеличивает продолжительность потенциалов действия. Установлено, что нейротоксины актиний обладают наибольшей аффинностью к каналам, домен VSDIV которых инактивирован [33,35,40]. Несмотря на отсутствие гомологии между токсинами

актиний и модуляторами Nav из других ядовитых организмов, нейротоксины конкурируют за сайт 3 с α-токсинами скорпионов (их сайты связывания частично совпадают, но не являются идентичными [42,57,58]), а также действуют синергетически с токсинами. взаимодействующими с сайтом 4 [51]. Установлено, что в образовании комплекса нейротоксина АТХ-II с rNav1.2 участвуют следующие а.о. канала: Glu1613, Leu1614, Glu1616, Lys1617, Val1620, Ser1621, Leu1624 и Leu1626 (VSDIV, линкер S3-S4) [57]; а Lys37 токсина ApB взаимодействует с а.о. Asp1612 rNav1.5 [59]. При этом считается, что остатки Nav, формирующие сайт связывания нейротоксинов актиний типов 1, 2 и 3, также могут различаться [55].

Для структурно-функциональных исследований нейротоксинов актиний, а также в качестве инструментов изучения токов, проходящих через поры VSD доменов (gating currents), использовали ApA, ApB и ATX-II [51,60]. Было установлено, что связывание ApB с сайтом 3 стабилизирует VSDIV в инактивированном состоянии, а для открытия Na<sub>V</sub> достаточно активации VSDI – VSDIII [33,60]. В отличие от других гомологичных нейротоксинов типа 1, ApA, ApB и ATX-II обладают кардиостимулирующей активностью [50]. Кроме того, ApA отличается высокой селективностью в отношении каналов Na<sub>V</sub>1.5, ApB – аффинностью в отношении каналов млекопитающих, в то время как ATX-II характеризуется высокой инсектицидной активностью [50,51,60].

Согласно результатам сканирующего мутагенеза, для поддержания пространственной структуры молекулы ApB необходимы следующие a.o.: Asp7, Asp9, Gly20, Ile43, a для образования комплекса с каналом – Asp9, Gly10, Gly15-Asn16, Leu18-Ser19, Lys37, Trp33 [61,62]. Конформационную подвижность Arg-петли обеспечивают такие a.o. ApB, как Pro3, Pro13, Gly10 и Gly15 [62], различия в активности и селективности ApA и ApB приписывают заменам Ser12Arg и Gln49Lys, a также Ser3Pro и Val13Pro, которые делают более жесткой структуру Arg-петли ApA [51,61,63]. Показано, что остаток Arg14 является высоко консервативным для большинства нейротоксинов типов 1 и 2. Изучение его роли с помощью химических модификаций привело к неоднозначным результатам, однако мутагенез ApB показал сравнительно небольшую функциональную значимость Arg14 по сравнению с Arg12 [63,64]. В то же время наличие положительно заряженных остатков в пределах «аргининовой» петли нейротоксина имеет большое значение для образования комплекса с каналом [63,64], поэтому роль Arg14 в молекулах нейротоксинов типа 2, где отсутсвует Arg12 (Рисунок 9), может быть более существенной.

В результате мутагенеза ATX-II было показано, что во взаимодействие с Na<sub>v</sub> каналами млекопитающих и насекомых вовлечены идентичные a.o.: Val2, Leu5, Asn16, Leu18 и Ile41, за исключением Ser19, замена которого влияет лишь на связывание с Na<sub>v</sub>1.5. Однако

функционально важные остатки ATX-II несколько отличаются от таковых молекулы ApB (Рисунок 10 Б), что может быть обусловлено различным направлением дипольных моментов молекул этих токсинов [49,65].

Показано, что активность токсина структурного типа 2, Sh1, значительно снижают замены a.o. Lys4, Asp6, Asp7, Glu8 и Asp11. Этот факт не коррелирует с результатами исследований ApB и ATX-II, а предполагаемые функционально значимые остатки нейротоксинов типа 1 не являются консервативными для нейротоксинов типа 2 [51].

Несмотря на то, что нейротоксины стали одними из первых охарактеризованных пептидов, продуцируемых актиниями, основная масса исследований была направлена на описание многообразия их структур. В связи с этим большинство проблем, связанных с экологической ролью нейротоксинов, их структурно-функциональными взаимосвязями и классификацией остается нерешенными. Действие подавляющего большинства нейротоксинов актиний на токи отдельных изоформ Nav каналов все еще остаются не исследованными, и этот факт, очевидно, не позволяет в полной мере оценить их потенциал.

#### 1.3 Протон-чувствительные ионные каналы (ASICs)

Известно, что ряд физиологических и патофизиологических процессов ассоциирован с изменением значения pH внеклеточной среды, активирующим специализированные рецепторы – кислото- (или протон-) чувствительные ионные каналы (acid-sensing ion channels – ASICs). ASIC каналы входят в суперсемейство дегенерин/эпителиальных натриевых каналов (DEG/ENaC) и кодируются генами ACCN1–ACCN4 [66] (Рисунок 11). Более 600 млн лет назад ASICs обособились от эпителиальных натриевых каналов (epithelial Na<sup>+</sup> channels – ENaC) [66] и приобрели способность реагировать на изменение важнейшего физико-химического параметра организма – определенного значения внеклеточного pH [67].



Каналы BASICs (Bile acid-sensitive ion channels), невосприимчивые к колебаниям pH, образуют отдельную ветвь. Длины ветвей отражают эволюционные расстояния, указаны соответствующие величины. Масштабная линейка отражает число аминокислотных замен на сайт

Рисунок 11 – Филогенетическое дерево ионных каналов человека (hENaC), входящих в семейство DEG/ENaC [66]

Три субъединицы ASICs объединяются друг с другом в гомо- или гетеромерный ионный канал [68]. Хотя базовые функции всех субъединиц одинаковы, формируемые ими каналы отличаются аффинностью к протонам, селективностью, кинетикой активации/десенситизации и

31

скоростью восстановления. Показано, что субъединицы ASIC2b и ASIC4 млекопитающих не образуют гомомерные каналы, способные генерировать токи при снижении значения pH [67,69,70]. Однако их ассоциация с ASIC1a, ASIC2a или ASIC3 приводит к изменению аффинности к протонам и кинетики десенситизации гетеромерных каналов [67,68,71]. ASIC каналы на порядок менее проницаемы для ионов  $K^+$ , чем для Na<sup>+</sup>, и в еще меньшей степени проницаемы для Ca<sup>2+</sup>. Тем не менее, гомомерные ASIC1a, ASIC1a и гетеромерные ASIC1a/2b каналы пропускают ионы Ca<sup>2+</sup>, а ASIC1a – протоны [72,73].

ASICs интенсивно экспрессируются как в ЦНС, так и в ПНС, участвуя в процессах механо- и хеморецепции, ноцицепции (восприятии боли), реализации вегетативных рефлексов, слухового и зрительного восприятия, запоминания и обучения, развития состояний тревоги и страха, подавления аддиктивного поведения при наркотической зависимости и т.д. [69,71,74]. В определенных условиях, при развитии воспалительного процесса, ASICs вовлекаются в процесс механотрансдукции [75]. Обилие ASIC каналов в сенсорных нейронах и других ноцицепторах позволяет считать их перспективной мишенью анальгетиков [76]. Установлено, что ASIC каналы принимают участие в развитии нейродегенеративных заболеваний [77]. В частности, активация ASIC1a каналов при ишемии вызывает рост концентрации Ca<sup>2+</sup> в клетках, что приводит к их гибели. При этом блокада ASIC1a может стать более перспективной стратегией для достижения нейропротекторного эффекта по сравнению, например, с блокадой глутаматных ионотропных рецепторов AMPA или NMDA [77,78].

В головном и спинном мозге млекопитающих экспрессируются в основном субъединицы ASIC1a, ASIC2a и ASIC2b [68,69]. Хотя субъединицы ASIC1a наиболее распространены в тканях ЦНС, более половины из них формируют гетеромерные ASIC1a/2a каналы [68]. Именно ASIC1a и ASIC1a/2a каналы рассматривают в качестве потенциальных мишеней лекарственных препаратов для лечения патологий ЦНС [68,73,77].

После открытия ASIC каналов, определения их функций в ЦНС и роли в развитии патологий нервной системы (эпилепсия, рассеянный склероз, болезнь Паркинсона, болезнь Хангтингтона, психические расстройства и т.д.) протоны стали рассматривать как важные нейротрансмиттеры [71,73,77,79]. Было установлено, что физиологическая активность нейронов вызывает локальные и кратковременные колебания значений рН синаптической щели (в пределах 0,2–0,6 единиц), достаточные для активации ASIC каналов, локализованных в постсинаптической мембране. При увеличении частоты импульсов наиболее чувствительные к колебаниям рН ASIC1a каналы десенситизируются (становятся невосприимчивы к присутствию протонов) [71,73]. Избежать десенситизации и увеличить время активации/инактивации каналов позволяет ассоциация ASIC1a с субъединицами ASIC2a и ASIC2b, которые

характеризуются меньшей аффинностью к протонам и более медленной кинетикой десенситизации [68,69,71,73].

В ряде исследований показано, что соотношение субъединиц ASIC в различных группах чувствительных нейронов в значительной степени варьирует, что позволяет каналам максимально эффективно детектировать локальные изменения в состоянии тканей или органов. Обязательным условием нормальной реакции нейронов ПНС на воспаление или ацидоз является присутствие субъединиц ASIC3 и ASIC1a [74,77,80], которые отличаются высокой чувствительностью к колебаниям pH и быстрой кинетикой активации/инактивации в условиях физиологического ацидоза (снижение pH на 0,4-1,0 единицы в результате накопления молочной кислоты или повышения метаболической активности) [71,73]. Активация ASIC каналов нейронов вызывает появление входящего Na<sup>+</sup> тока. Результатом этого становится деполяризация клеточной мембраны, активирующая Na<sub>V</sub> и K<sub>V</sub> каналы, которые, в свою очередь, обеспечивают возникновение потенциала действия, передавая электрический сигнал вдоль мембраны. С другой стороны, десенситизация ASICs способна приводит к ингибированию активности сенсорных нейронов [73,76,81].

Помимо этого, ASIC каналы должны сохранять способность реагировать и на глубокий ацидоз, зачастую сигнализирующий о патологии. Эту функцию выполняют ASIC3- и ASIC1bсодержащие каналы, которые десенситизируются не полностью [71,73]. При сильном снижении pH (менее 4,5) возникает постоянный (стационарный) ток, он не исчезает до тех пор, пока во внеклеточной среде есть протоны [69,71]. Величина этого тока возрастает в присутствии молекул-предшественников воспалительного процесса, например, арахидоновой кислоты, и может составлять до 30% максимальной величины тока, что еще больше увеличивает чувствительность каналов. Кроме того, медиаторы воспаления влияют на уровень экспрессии ASIC каналов, в том числе при переходе от острых патологических состояний к хроническим [69,71,76].

# 1.3.1 Пространственная структура ASIC каналов и механизм их активации десенситизации

Трансмембранный домен ASIC субъединицы представлен двумя гидрофобными фрагментами (TM1 и TM2), которые расположенны на концах протяженного внеклеточного участка и формируют пору канала (Рисунок 12). Внеклеточный участок включает 7 α-спиралей (α1 – α7), 12 β-тяжей (β1 – β12) и имеет форму «кисти, сжимающей мяч» (Рисунок 12 A) [82,83]. Между доменами «большой палец», «β-мяч» и «палец» одной субъединицы и доменом «ладонь» другой субъединицы находится протон-связывающий сайт – так называемый «кислотный карман» (acidic pocket) (Рисунок 13). Замена кислых аминокислотных остатков, расположенных в этом углублении, на нейтральные приводит к потере чувствительности канала

к колебаниям значений pH. Помимо «кислотного кармана», сайтами протонирования являются домены «ладонь» и «запястье» [81,84–86].



A – Строение субъединицы, участки цепи окрашены в соответсвии с выполняемыми функциями (здесь и далее). Б – Пора канала в состоянии релаксации, цветом обозначен радиус поры (красный < 1.15 Å < зеленый < 2.3 Å < фиолетовый). На рисунках (А) и (Б) показаны две из трех субъединиц [83]. В-Г – Трансмембранные спирали ТМ2а и ТМ2b, вид сверху (В) и сбоку (Г). Ионы Na<sup>+</sup> изображены в виде желтых сфер [87]



ASIC канал находится в состоянии релаксации при физиологическом значении pH (Рисунок 13 А). При снижении pH (пороговое значение зависит от подтипа канала) он переходит в проводящее состояние (Рисунок 13 Б). При более продолжительном присутствии протонов во внеклеточной среде происходит десенситизация канала (Рисунок 13 В). Установлено, что непосредственная взаимосвязь между состоянием поры канала и значением pH отсутствует [83,84,86].



Рисунок 13 – Схематическое изображение конформационных изменений (обозначены черными и красными стрелками), сопровождающих активацию и десенситизацию ASIC канала, изображены две из трех субъединиц канала [81]

Связующим звеном между концентрацией протонов и состоянием воротного механизма канала является сужение «кислотного кармана», которое сопровождается образованием системы протон-опосредованных связей межу доменами «большой палец», «палец» и «ладонь»

(a.o. Asp238/Asp350, Glu239/Asp346, Glu220/Asp408, Glu80/Glu417 cASIC1) [81–83,88] (Рисунок 14). Оно инициирует конформационные изменения внеклеточной части канала, которые передаются нижнему участку домена «ладонь» и трансмембранным сегментам. В результате увеличивается диаметр трех боковых отверстий, расположенных в области «запястья» (fenestrations, Рисунок 13 A), через которые катионы попадают во внеклеточный вестибюль канала [81,83] (Рисуноки 12 Б, 13 Б).



Субъединицы окрашены в розовый и голубой цвета, показаны боковые цепи и соответствующая электронная плотность а.о. Asp238/Asp350, Glu239/Asp346, Glu220/Asp408 и соседних остатков. Пунктиром обозначены нековалентные взаимодействия остатков, стабилизирующие суженный «карман»

Рисунок 14 – Ленточная диаграмма 3D структуры «кислотного кармана» десенситизированного сASIC1 канала [82]

Десенситизированный ASIC канал находится в так называемой «смешанной конформации» («conformationally chimeric»). Несмотря на то, что «карман» все еще сужен под воздействием низкого значения pH, пора десенситизированного канала остается закрытой (Рисунок 13 В). Согласованность между состояниями внеклеточной части канала и поры определяет конформация «молекулярной застежки» («molecular clutch»), участка β11–β12 (hASIC1a, Gln276, Leu415 и Asn416), который находится на границе верхней и нижней частей домена «ладонь» [83,84,86,89].

ASIC каналы были описаны не так давно, однако установлено, что они являются неотъемлемыми участниками ряда физиологических и патофизиологических процессов и могут стать новыми молекулярными мишенями анальгетических и нейропротекторных соединений. К сожалению, на сегодняшний день еще не был разработан ни один препарат, нацеленный на взаимодействие с ASICs. Более глубокое понимание молекулярного механизма функционирования каналов, несомненно, будет способствовать решению этой проблемы.

## 1.4 Соединения, модулирующие активность ASIC каналов

## 1.4.1 Токсины пауков

Некоторые наземные ядовитые арахниды продуцируют ряд модуляторов ASIC каналов [86,90]. Так, в яде южноамериканского тарантула *Psalmopoeus cambridgei* идентифицирован пептид Pi-theraphotoxin-Pc1a (PcTx1), состоящий из 40 а.о. (молекууулрная масса 4689 Да) [91].

Его третичная структура представляет собой характерный для токсинов насекомых фолд – «ингибиторный цистиновый узел» (inhibitor cystine knot – ICK), стабилизированный тремя дисульфидными мостиками (Cys3-Cys18, Cys10-Cys23, Cys17-Cys33) (Рисунок 15 А). Аминокислотные остатки токсина His14-Gly15-Asp16 формируют 3<sub>10</sub>-спираль. Два антипараллельных тяжа (а.о. 21–24 и 32–35) соединяет гибкая β-шпилька, содержащая положительно заряженные остатки (Lys25-Arg26-Arg27-Arg28) (Рисунок 15 Б). Это исключительно важный фрагмент молекулы PcTx1, способный проникнуть в узкий «кислотный карман» канала [90,92,93].



А – На схеме обозначено открытое (О), закрытое (С) и десенситизированное (D) состояние каналов, включая протонированные состояния (H<sub>1</sub> – H<sub>4</sub>), соответствующие значению внеклеточного pH. Токсин, связавшийся с каналом, обозначен курсивом. Рамкой обозначено наиболее стабильное состояние канала в комплексе с PcTx1. Ингибирующий и потенцирующий эффекты PcTx1 показаны черными и серыми стрелками

Рисунок 15 – Выравнивание аминокислотных последовательностей токсинов пауков PcTx1 и Hm3a (A), ленточная диаграмма 3D структуры PcTx1 [94] (Б) и механизм действия PcTx1 на rASIC1a, rASIC1b и cASIC1 каналы [95] (В-Д)

Общий механизм действия PcTx1 на активацию/десенситизацию ASICs заключается в увеличении кажущейся аффинности каналов к протонам. (При этом кривые активации и десенситизации смещаются в направлении бо́льших значений pH). В большинстве случаев это
приводит к десенситизации канала (ASIC1a). Однако, если состояние десенситизации не достигается, связывание PcTx1 способствует открытию канала (cASIC1, ASIC1b) в присутствии протонов [96]. Таким образом, в зависимости от величины pH токсин PcTx1 может как ингибировать, так и потенцировать один и тот же канал (Рисунок 15 В-Д, Таблица 1).

Таблица 1 – Активность токсинов-модуляторов, продуцируемых пауками, змеями и актиниями, в отношении различных подтипов ASIC каналов

Ингибиторы ASICs								
Канал	Токсин	IC <sub>50</sub> , нМ		Канал	Токсин	IС <sub>50</sub> , нМ		
rASIC1a	$D_0 T_{y} 1$	0,9 *	[91]	ASIC1b	Ma 2	44	***	
rASIC1a/2a	FUIXI	2,9 *	[97]	ASIC1a/2a	Ma-5	252		
rASIC1a	Hm3a	$1,3 \pm 0,2$	[94]	hASIC3	Ugr 9-1	$(10 \pm 0.6) \times 10^3 **$ $(1.44 \pm 0.19) \times 10^3$	[98]	
rASIC1a	Hi1a	0,4	[78]	rASIC3		63		
ASIC1a		55		hASIC3		175	[99]	
ASIC1a/2a	Mo 1	246		ASIC1a/3	APETx2	$2 \times 10^3$		
ASIC1a/2b	Ma 2	61	[100]	ASIC1b/3		$117 \times 10^3$		
ASIC1a/1b	Ivia-2	72		ASIC2b/3		$117 \times 10^{3}$		
ASIC1b		192			Hcr	$(5,5 \pm 1,0) \times 10^3$	[101]	
ASIC1a	Ma-3	17	***	IIASIC5	1b-1		[101]	
			Потен	циаторы ASIC	's			
Канал	Токсин	EC <sub>50</sub> , нМ		Канал	Токсин	EC <sub>50</sub> , нМ		
rASIC1a		~150 *	[102]	rASIC1b		$46,5 \pm 6,2$		
rASIC1a/2a	PcTx1	56,1 *	[97]	rASIC10/1b	Hm3a	$7.4 \pm 0.5$	[94]	
rASIC1b		~100	[102]	TASIC 14/10		7,4 ± 0,5		
Активатор ASICs								
Канал	Токсин	EC <sub>50</sub> , нМ		Канал	Токсин	EC <sub>50</sub> , нМ		
ASIC1a	MitTx	$9,4 \pm 1,3$	[103]	A SIC3	MitTx	$830 \pm 250$	[103]	
ASIC1b	α/β	$23 \pm 3,6$	[103]	ASICS	α/β	$650 \pm 250$	[103]	
=								

Примечания

1. \*РсТх1 проявляет ингибирующую активность в условиях, предшествующих десенситизации канала – индуцирующий ток pH 6,0, токсин апплицировали при pH 7,4 (rASIC1a) и 7,0 (ASIC1a/2a); PcTx1, апплицированный при pH 7,4, потенцирует токи, вызванные pH 7,1 (rASIC1a) и 6,8 (ASIC1a/2a).

2. **\*\*** Приведенные значения IC<sub>50</sub> для токсина Ugr 9-1 соответствуют ингибированию пиковой и стационарной компонент тока ASIC3.

3. \*\*\*Данные об активности токсина Ма-3 получены из аннотации в базе UniProt (C0HJB0)

В качестве антагониста PcTx1 способствует стабилизации ASICs в состоянии десенситизации при физиологическом значении pH. Наименьшая концентрация токсина требуется для десенситизации гомомерных ASIC1a каналов млекопитающих (rASIC1a IC<sub>50</sub> 0,9 нМ, pH 6,0 [91]). Однако, чем менее чувствителен канал к снижению pH, тем большая концентрация токсина необходима [90,96]. С увеличением значения pH ингибирующий эффект PcTx1 исчезает из-за низкой кажущейся аффинности токсина к каналу в закрытом состоянии [102] (Pucyhok 15 B). Показано, что PcTx1 потенцирует ток, вызванный аппликацией раствора с pH 7,1 (rASIC1a EC<sub>50</sub> ~150 нM, pH 7,1 [102]) [96]. При этом ASIC1a каналы переходят в открытое состояние, несмотря на то, что аффинность PcTx1 к открытым ASIC1a каналам ниже,

чем к десенситизированным (Рисунок 15 В). Для десенситизации ASIC1a канала необходимо связывание трех молекул токсина, но для достижения потенцирующего эффекта достаточно одной или двух молекул PcTx1 [96,102].

РсТх1 способен модулировать активность гетеромерных каналов ASIC1a/2a и ASIC1a/2b. Ингибирующий эффект PcTx1 в отношении rASIC1a/2a проявляется только в условиях, предшествующих десенситизации канала (IC<sub>50</sub> 2,9 нМ, pH 6,0), так же, как в случае с ASIC1a. При физиологическом значении pH токсин потенцирует rASIC1a/2a (EC<sub>50</sub> 56,1 нМ, pH 6,8) [97]. Наиболее эффективно PcTx1 ингибирует rASIC1a/2a каналы, содержащие две субъединицы ASIC1a, поскольку они более чувствительны к снижению значения pH [104]. В качестве ингибитора ASIC1a и ASIC1a/2b каналов токсин PcTx1 проявил себя как перспективный нейропротектор, несмотря на его недостаточную селективность и зависимость эффекта от значения pH [105].

РсТх1 потенцирует также rASIC1b каналы (EC<sub>50</sub> ~100 нM, pH 6,6), стабилизируя открытый канал, а не десенситизированный, как в случае ASIC1a [102] (Рисунок 15 Г). Установлено, что низкая кажущаяся аффинность PcTx1 к десенситизированным ASIC1b каналам определяется небольшим участком внеклеточного домена (rASIC1a a.o. 167–185). Под воздействием токсина десенситизация канала замедляется (хотя кривая десенситизации PcTx1 практически не сдвигается), а кривая активации канала смещается в направлении больших значений pH. Незначительное ингибирование токов ASIC1b, вызванных снижением pH внеклеточной среды до значения 5,0, наблюдается только в результате аппликации 100 нM PcTx1 при pH 6,9, поскольку ASIC1b имеет заметно меньшую, по сравнению с ASIC1a, аффинность к протонам [102].

РсТх1 является одновременно активатором и потенциатором cASIC1 каналов, он вызывает токи при физиологическом значении pH и усиливает протон-индуцированные токи (Рисунок 15 Д). Аппликация токсина при pH 7,35 не позволяет каналу вернуться в непроводящее состояние и приводит к появлению новой компоненты тока, которая напоминает стационарный ток ASIC3 (window current). Этот ток ингибируется при снижении значения pH, которое, тем не менее, не способно вызвать диссоциацию комплекса канала с токсином [106]. PcTx1 (10 нМ), апплицированный при физиологическом значении pH, не влияет на токи ASIC2a, ASIC3 и ASIC1a/3 каналов [91].

Установлено, что сайтами связывания молекул PcTx1 с ASIC каналом являются три «кислотных кармана» (Рисунок 16). В результате образования комплекса с токсином фиксируется взаимное расположение доменов «большой палец», «палец», «β-шар» и «ладонь». Аминокислотные остатки гидрофобного (Trp7, Trp24, Phe30) и основного (Lys6, Lys8, Arg26) кластеров на поверхности PcTx1 взаимодействуют со спиралью α5 домена «большой палец», а остатки Arg27 и Arg28 проникают глубоко в «кислотный карман» канала и нарушают сеть протон-опосредованных связей между «сенсорами протонов» (cASIC1, Asp238/Asp350, Glu239/Asp346 и Asp260/Glu354), регулируя, таким образом, локализацию верхней части домена «ладонь» [90,92,93] (Рисунок 16). При этом остатки Arg26 и Phe30 пептида PcTx1 стабилизируют  $\beta$ -шпильку таким образом, чтобы обеспечить боковым цепям Arg27 и Arg28 возможность взаимодействия с остатками канала в «кармане». Связывание PcTx1 с сенсором протонов вызывает конформационные изменения  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 10,  $\beta$ 11,  $\beta$ 12 тяжей и  $\alpha$ 6,  $\alpha$ 7 спиралей, которые приводят в движение трансмембранные сегменты канала [88].



Рисунок 16 – 3D структура комплекса PcTx1 с сАSIC1 каналом. Показана доступная растворителю поверхность канала и боковые цепи функционально важных остатков PcTx1 [93]

Из яда африканского тарантула *Heteroscodra maculate* выделен токсин Pi-theraphotoxin-Hm3a (Hm3a), состоящий из 37 а.о. (4287 Да) [94]. Его аминокислотная последовательность идентична последовательности токсина PcTx1 на 82% (Рисунок 15 A). Очевидно, пространственная структура Hm3a представляет собой ICK фолд. Предполагается, что низкая (по сравнению с PcTx1) активность Hm3a обусловлена отсутствием в его структуре C-концевых аминокислотных остатков, характерных для PcTx1, в частности Pro38. Другие аминокислотные замены, отличающие Hm3a от PcTx1 (Pro2Asp, Ser9Gly, Ala19Glu, Lys28Arg и Val37Thr), не влияют на активность токсина [94].

Электрофизиологические эксперименты продемонстрировали, что механизм и кинетика взаимодействия токсинов Hm3a и PcTx1 с ASIC каналами практически идентичны. Hm3a ингибирует гомомерные rASIC1a каналы (IC<sub>50</sub> 1,3 ± 0,2 нM, pH 7,45), но не модулирует ASIC2a или ASIC3 (10 мкМ). В то же время токсин потенцирует rASIC1b (EC<sub>50</sub> 46,5 ± 6,2 нМ) и rASIC1a/1b (EC<sub>50</sub> 7,4 ± 0,5 нM, pH 7,45) [94]. Установлено, что противоположный эффект и разница в активности Hm3a в отношении ASIC1a и ASIC1b каналов являются результатом

аминокислотных замен Arg175Cys и Glu177Gly (rASIC1a, домен «ладонь»). Интересно, что мутация Phe350Ala (rASIC1a, домен «большой палец», спираль α5), вызывающая потерю ингибирующего эффекта PcTx1, позволяет Hm3a потенцировать ток в концентрации 100 нМ – 1 мкМ; ингибирование же требует концентрации токсина свыше 3 мкМ (pH 7,35), что обеспечивает взаимодействие с каналом трех молекул Hm3a [94].

В результате анализа транскриптома ядовитых желез австралийского воронкового паука Hadronyche infensa был идентифицирован токсин Pi-hexatoxin-Hi1a (Hi1a) [78]. Он состоит из 75 а.о. (8636 Да) и представляет собой два домена ICK, соединенных коротким пептидным линкером (Рисунок 17). Каждый домен ІСК стабилизирован тремя дисульфидными мостиками Суѕ10-Суѕ23, Суѕ17-Суѕ33 и Суѕ40-Суѕ55, (Cys3-Cys18, Cys47-Cys60, Cys54-Cys71). N- и С-концевых Аминокислотные последовательности доменов Hila идентичны последовательности РсТх1 на 62 и 50% соответственно (Рисунок 17 А). Согласно данным ЯМР спектроскопии, β-шпилька N-концевого домена такая же гибкая, как в структуре PcTx1, в то время как β-шпилька C-концевого домена Hila имеет более упорядоченную структуру (Рисунок 17 Б) [78].





Рисунок 17 – Выравнивание аминокислотных последовательностей токсинов Hi1a и PcTx1(A), ленточная диаграмма 3D структуры Hi1a (Б) [90]

Токсин Hi1a является самым активным из известных блокаторов ASIC1a каналов (rASIC1a, IC<sub>50</sub> 0,4 нM, pH 7,45 [78]) (Таблица 1). Показано, что, в отличие от PcTx1, ингибирующий эффект токсина Hi1a на ASIC1a практически не зависит от значения pH. Благодаря своей высокой активности в отношении ASIC1a каналов, токсин Hi1a проявил себя в качестве эффективного нейропротектора *in vitro* и *in vivo*, превзойдя по эффективности PcTx1. В то же время Hi1a ингибирует не более 80% тока ASIC1a, и его эффект трудно обратить из-за низкой скорости диссоциации комплекса. Токсин Hi1a не оказывает эффекта на токи rASIC2a и rASIC3 каналов (1 мкM), но незначительно потенцирует rASIC1b [78].

В отличие от PcTx1, который способствует десенситизации канала, токсин Hi1a стабилизирует ASIC1a канал в закрытом состоянии [78]. Главным образом это происходит

благодаря снижению скорости активации канала (кривая активации лишь незначительно сдвигается в направлении меньших значений pH), практически не затрагивая процесс его десенситизации. Установлено, что уникальный механизм действия Hila обусловлен наличием двух доменов ICK в структуре токсина. Именно наличие С-концевого домена Hila обеспечивает высокую активность токсина и неполное ингибирование тока, но только при условии объединения с N-концевым доменом. Вероятно, Hila связывается с каналом в области «кислотного кармана». Это предположение подтверждается тем, что мутация Phe350Ala (rASIC1a, спираль α5) делает канал нечувствительным к воздействию Hila [78].

#### 1.4.2 Токсины змей

Яды змей также содержат модуляторы ASIC каналов [86,90]. Из яда черной мамбы *Dendroaspis polylepis polylepis* выделено два высоко гомологичных токсина, мамбалгин-1 (Ма-1) (6554 Да) и мамбалгин-2 (Ма-2) (6538,4 Да) [100]. Еще один токсин, мамбалгин-3 (Ма-3) (6566,6 Да), был получен из яда восточной зеленой мамбы *Dendroaspis angusticeps*. Все три пептида состоят из 57 а.о., содержат восемь остатков Cys и имеют идентичную схему расположения дисульфидных мостиков (Cys3–Cys19, Cys12–Cys37, Cys41–Cys49 и Cys50–Cys55) [100] (Рисунок 18 А).



А – Обозначения на схеме аналогичны рисунку 15 В-Д [95]

Рисунок 18 – Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей мамбалгинов (А), механизм ингибирующего действия токсина Ma-1 на rASIC1a канал [95] (Б) и ленточная диаграмма 3D структуры субъединицы сASIC1 в комплексе с Ma-1 [107] (В)

Мамбалгины входят в группу так называемых трехпетельных токсинов змей (three-finger toxins – TFTs). Центральная часть молекулы мамбалгина стабилизирована четырьмя дисульфидными связями, а также сетью водородных связей. Из центра молекулы выходят три

петли; петли I (а.о. 4–11) и III (а.о. 42–48) заметно короче, чем в других TFTs и имеют четко определенную третичную структуру. Наиболее протяженная петля II (а.о. 20–36), напротив, включает неупорядоченный участок (а.о. 23–33). Три β-тяжа петель II и III формируют антипараллельный β-лист. Петля I образует отдельный двухтяжевый антипараллельный β-лист [100,107,108].

Установлено, что Ma-1 и Ma-2 быстро и обратимо ингибируют ASIC1a (IC<sub>50</sub> 55 нM), ASIC1a/2a (IC<sub>50</sub> 246 нM), ASIC1a/2b (IC<sub>50</sub> 61 нM), ASIC1b (IC<sub>50</sub> 192 нM) и ASIC1a/1b (IC<sub>50</sub> 72 нM) каналы [100]. Согласно данным базы UniProt, Ma-3 ингибирует ASIC1a (IC<sub>50</sub> 17 нM), ASIC1b (IC<sub>50</sub> 44 нM) и ASIC1a/2a (IC<sub>50</sub> 252 нM) каналы. Благодаря ингибированию ASIC1a-, ASIC2a- и ASIC1b-содержащих каналов, Ma-1 и Ma-2 оказывают анальгетический эффект *in vivo* в моделях острой или нейропатической боли и воспаления [100,109]. Ma-3 также оказывает анальгетическое действие при острой боли и воспалении. Токсины Ma-1 и Ma-2 не модулируют каналы ASIC2a, ASIC3, ASIC1a/3, ASIC1b/3, TRPV1, P2X<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, Na<sub>V</sub>1.8, Ca<sub>V</sub>3.2 и K<sub>V</sub>1.2 [100]. Maмбалгины снижают чувствительность каналов к протонам, смещая кривую активации ASIC1 в направлении меньших значений pH [100]. Образование комплекса с токсином стабилизирует закрытое или десенситизированное состояние ASIC каналов (рисунок 18 Б) [95]. Этому также способствует незначительный сдвиг кривой инактивации в направлении бо́льших значений pH.

Вопреки гипотезе, предполагающей взаимодействие Ma-2 с доменами «большой палец», « $\beta$ -мяч» и «ладонь» [108,110], методом криоэлектронной микроскопии было показано, что молекула Ma-1 связывается с внешней стороной домена «большой палец», не проникая в «кислотный карман» (Рисунок 18 В) [107]. Это приводит к увеличению расстояния между доменами «палец», « $\beta$ -мяч» и «большой палец» и препятствует образованию протонопосредованных связей Asp238/Asp350, Glu239/Asp346 (cASIC1), стабилизирующих суженный «карман» канала, находящегося в открытом состоянии. В результате cASIC1 канал теряет способность реагировать на снижение значения pH [107]. В образовании комплекса с Ma-1, вероятно, принимают участие остатки спиралей  $\alpha$ 4 и  $\alpha$ 5: Arg316, Tyr317, Asp346, Phe351 и Asp356 (cASIC1), взаимодействующие с основными и гидрофобными остатками Ma-1: His6/Lys8 (петля I), Arg28/Lys31 и Met25/Pro26/Phe27/Leu30/Leu32 (петля II). Результаты электрофизиологического тестирования в сочетании с мутагенезом продемонстрировали важность остатков Gln5, His6, Lys8, Phe27, Arg28, Leu32, Ile33 и Leu34 для сохранения ингибирующей активности Ma-1 [107,111].

 $\alpha$ -Дендротоксин ( $\alpha$ -DTx) (7065 Да), полученный из яда *D. angusticeps*, будучи широко известным ингибитором K<sub>v</sub>1.1, K<sub>v</sub>1.2 и K<sub>v</sub>1.6 каналов [112], оказался способен ингибировать также ASIC каналы [113].  $\alpha$ -DTx состоит из 59 а.о. и стабилизирован тремя дисульфидными связями (Cys7-Cys57, Cys16-Cys40, Cys32-Cys53) (Рисунок 19 А). Дендротоксины гомологичны

(35%) ингибиторам сериновых протеаз Кунитц-типа и имеют характерный Кунитц-фолд: 3<sub>10</sub>спираль на N-конце, β-шпилька – двухтяжевый антипараллельный β-лист (а.о. 19–27 и 31–38) и короткая α-спираль на C-конце (а.о. 50–58) (Рисунок 19 Б) [114].



Рисунок 19 – Выравнивание аминокислотных последовательностей α-DTx и BPTI (A), ленточные диаграммы 3D структур α-DTx [114] (Б) и субъединицы сASIC1 канала в комплексе с токсином MitTxα/β [87] (В), взаимодействия между субъединицей MitTxα и доменом «большой палец» (Г) [87]

 $\alpha$ -DTx способен обратимо ингибировать пиковый ток ASICs (IC<sub>50</sub> 0,8 мкМ) в культуре DRG-нейронов крысы, не оказывая влияния на стационарный ток в концентрации менее 3 мкМ. Таким образом, он ингибирует ASICs существенно слабее, чем K<sub>V</sub> каналы. Результаты электрофизиологических исследований позволяют предположить, что  $\alpha$ -DTx не влияет на скорость десенситизации каналов, он либо связывается с релаксированными ASIC каналами, либо скорость его ассоциации с открытыми каналами достаточно низкая [113]. Еще два пептида Кунитц-типа, *Eg*KU-1 и *Eg*KU-4, способные ингибировать токи ASIC каналов, экспрессирующихся DRG нейронами, были обнаружены в ленточных червях *Echinococcus granulosus* [115].

Из яда Техасской коралловой змеи *Micrurus tener tener* был выделен первый агонист ASIC каналов, который представляет собой комплекс из двух нековалентно связанных субъединиц MitTx $\alpha$  и MitTx $\beta$  (Рисунок 19 В). MitTx $\alpha$  и MitTx $\beta$  являются гомологами пептидов Кунитц-типа и фосфолипаз A2 соответственно, но ни один из пептидов не обладает соответствующей биологической активностью. Кроме того, ни MitTx $\alpha$ , ни MitTx $\beta$  по отдельности не способны модулировать ASIC каналы [103]. Показано, что аппликация комплекса MitTx $\alpha/\beta$  вызывает устойчивые токи через ASIC1a и ASIC1b каналы (EC<sub>50</sub> 9,4 ± 1,3 и 23 ± 3,6 нM), которые могут превосходить по амплитуде и продолжительности протон-индуцированные токи. Под воздействием MitTx $\alpha/\beta$  каналы долгое время находятся в открытом состоянии и не десенситизируются. Примечательно, что каналы ASIC1a, блокированные PcTx1, не способны активироваться MitTx $\alpha/\beta$ , а каналы, активированные MitTx $\alpha/\beta$ , не блокируются PcTx1 [103]. Для активации ASIC3 каналов требуется примерно в 100 раз более высокая концентрация MitTx $\alpha/\beta$  (EC<sub>50</sub> 830 ± 250 нM). Низкая чувствительность ASIC3 сопровождается более медленной активацией канала и быстрой диссоциацией комплекса с токсином по сравнению с таковыми ASIC1a и ASIC1b каналов. Активация ASIC2a очень незначительна, но MitTx $\alpha/\beta$  эффективно потенцирует протон-индуцированные токи через эти каналы. Установлено, что MitTx $\alpha/\beta$  не модулируют ионные каналы ENaC, TRP, P2X и 5-HT<sub>3</sub> [103].

Каждый димер MitTx $\alpha/\beta$  взаимодействует практически с одной единственной субъединицей канала (Рисунок 19 В), образуя обширную сеть контактов с доменами «запястье», «ладонь» и «большой палец» (Рисунок 19 Г). Основные конформационные изменения канала, вызванные связыванием с MitTx $\alpha/\beta$ , затрагивают нижнюю часть домена «ладонь», «запястье» и пору. Внеклеточный вестибюль канала расширяется, что приводит к транслокации трансмембранных сегментов и открытию поры. Интересно, что кластеры остатков MitTx $\alpha/\beta$ , необходимые для образования гетеродимера и взаимодействия с ASICs, соответствуют остаткам, которые необходимы гомологичным пептидам для взаимодействия с совершенно другими молекулярными мишенями [87].

## 1.4.3 Токсины актиний

Из яда актинии *Phymanthus crucifer* выделен модулятор ASIC каналов пептидной природы, pi-PMTX-Pcr1a (PhcrTx1) (3477 Да) [116]. Аминокислотная последовательность этого токсина содержит 32 а.о. и три дисульфидных мостика (Cys1-Cys15, Cys8-Cys20, Cys14-Cys28) (Рисунок 20 А). Он был первым описанным токсином стрекающих, который имеет классический шестицистеиновый ICK фолд: двухтяжевый антипараллельный  $\beta$ -лист (a.o. 19–21 и 26–29) и N-концевая петля (Рисунок 20 В). На поверхности молекулы PhcrTx1 локализованы кластеры основных и ароматических остатков, Lys11/Trp19 и Arg24/Tyr29/Lys30, которые характерны для токсинов-модуляторов K<sub>V</sub> каналов. PhcrTx1 обратимо ингибирует токи ASIC каналов, экспрессирующихся DRG нейронами крысы (IC<sub>50</sub> ~ 100 нМ), не затрагивая процесс десенситизации каналов и не влияя на стационарный ток. Установлено, что токсин связывается с релаксированными ASIC каналами и взаимодействует с их внеклеточным доменом. PhcrTx1

не модулирует Na<sub>v</sub>, но ингибирует K<sub>v</sub> каналы в микромолярной концентрации, т.е. значительно менее эффективно, чем ASICs каналы [116].



Рисунок 20 – Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей токсинов актиний, PhcrTx1(A) и Ugr 9-1 (Б), модулирующих ASICs, и их гомологов, PcTx1 и Ugr 9-2/Ugr 22, и ленточные диаграммы модели PhcrTx1 [116] (В) и 3D структуры Ugr 9-1 [98] (Г)

Из яда актинии Urticina grebelnyi выделен токсин Pi-AnmTX Ugr 9a-1 (Ugr 9-1) (3136 Да), содержащий 39 а.о. и две дисульфидные связи (Cys10-Cys26 и Cys7-Cys19) (Рисунок 20 Б). Пространственная структура молекулы Ugr 9-1 представляет собой три классических  $\beta$ -изгиба (а.о. 8-11, 14-17, 22-25) и скрученную  $\beta$ -шпильку (а.о. 11-21) (Рисунок 20 Г) [98]. Ugr 9-1 – это единственный токсин, который ингибирует как пиковый (hASIC3, IC<sub>50</sub> 10 ± 0,6 мкM), так и стационарный (hASIC3, IC<sub>50</sub> 1,44 ± 0,19 мкM) ток через ASIC3 каналы. Благодаря своей способности ингибировать ASIC3, токсин оказывает анальгетический эффект *in vivo* в моделях боли, вызванной воспалением, и кислотоиндуцированной мышечной боли. Ugr 9-1 не модулирует каналы ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a (50 мкM) и K<sub>v</sub>1.3 (1 мкM) [98]. Результаты мутагенеза в сочетании с результатим компьютерного моделирования демонстрируют, что на противоположных сторонах молекулы Ugr 9-1—расположены два функционально важных участка. Они представляют собой кластеры основных и ароматических остатков: Arg8, Phe9, Tyr11, His12, Arg13, Tyr21 и Tyr24 (Рисунок 20 Г). На основе неактивного гомолога Ugr 9-1, пептида Ugr 9-2, был получен новый синтетический ингибитор ASIC3, названный Ugr22 [117] (Рисунок 20 Б).

Из яда актинии Anthopleura elegantissima выделен токсин pi-AnmTX Ael 1b-2 (APETx2) (4557,96 Да), который состоит из 42 а.о. и содержит три дисульфидных связи (Cys4-Cys37,

Сузб-Суз30, Суз20-Суз38) [99] (Рисунок 21 А). Его пространственная структура представляет собой четырехтяжевый антипараллельный  $\beta$ -лист (а.о. 3–5, 10–14, 28–31, 36–39), стабилизированный тремя дисульфидными мостиками и сетью водородных связей;  $\beta$ -тяжи соединены меду собой двумя  $\beta$ -изгибами (а.о. 6–9, 32–35) и гибкой петлей (а.о. 15–17) (Рисунок 21 Б) [118]. Установлено, что для сохранения ингибирующей активности APETx2 в отношении ASIC3 каналов необходимы а.о. Thr2, Phe15, Tyr16, Arg17, Phe33, Leu34, которые частично совпадают с кластером остатков APETx2 (Pro18, Phe33, Leu34), участвующим в ингибировании калиевого канала hERG (Рисунок 21 В) [118].



Б – Визуализация выполнена с помощью программы Chimera, дисульфидные связи (стержневые фрагменты) окрашены черным. В – Цветом показаны аминокислотные остатки, необходимые для сохранения ингибирующей активности APETx2 в отношении hERG и ASIC каналов [118]

Рисунок 21 – Выравнивание аминокислотных последовательностей пептидов актиний, APETx2 и Hcr 1b-1, модулирующих ASICs (A), ленточная диаграмма 3D структуры APETx2 (PDB ID: 1WXN [119]) (Б), и молекулярная поверхность APETx2 (B) [118]

Токсин APETx2 стал первым идентифицированным токсином-модулятором ASIC3 и ASIC3-содержащих каналов. Он обратимо ингибирует пиковый ток через ASIC3 (rASIC3, IC<sub>50</sub> 63 нM, hASIC3, IC<sub>50</sub> 175 нM), ASIC1a/3 (IC<sub>50</sub> 2 мкM), ASIC1b/3 (IC<sub>50</sub> 117 мкM) и ASIC2b/3 (IC<sub>50</sub> 117 нM) каналы [99], а также эффективно потенцирует протон-индуцированные токи ASIC1b и ASIC2a каналов (1–10 мкM), снижая скорость десенситизации ASIC1b и увеличивая скорость активации ASIC2a, таким образом, стабилизируя каналы в открытом состоянии [120]. APETx2 ингибирует также токи Na<sub>V</sub>1.2 (IC<sub>50</sub> 114 ± 25 нM), Na<sub>V</sub>1.8 (IC<sub>50</sub> 55 ± 10 нM) и менее эффективно ингибирует Na<sub>V</sub>1.6 [121]. Он не модулирует каналы ASIC1a (1-10 мкM) [120], ASIC2a/3 (3 мкM), K<sub>V</sub>1.4, K<sub>V</sub>2.2, K<sub>V</sub>3.1, K<sub>V</sub>4.1, K<sub>V</sub>4.2, K<sub>V</sub>4.3 (300 нM) [99], но ингибирует K<sub>V</sub>3.4 (3 мкM) [99] и hERG (IC<sub>50</sub> 1,21 ± 0,05 мкM) [118]. Ингибирование ионных каналов, вовлеченных в

ноцицепцию, обсловливает анальгетический эффект APETx2 в моделях кислотоиндуцированной мышечной [122] и хронической боли, вызванной воспалением [120], а также улучшает состояние экспериментальных животных при остром поражении слизистой желудка [123].

Гомологом APETx2 является пептид  $\pi$ -AnmTX Hcr 1b-1 (Hcr 1b-1) (4537 Да) (гомология 49%), выделенный из актинии *H. crispa* [101]. Он включает 41 а.о. и содержит три дисульфидные связи (Cys4-Cys37, Cys6-Cys30, Cys20-Cys38) (Рисунок 21 А). Пространственная структура молекулы Hcr 1b-1 экспериментально не установлена, но, очевидно, пептиды APETx2 и Hcr 1b-1 имеют общий фолд [101]. Как и APETx2, пептид Hcr 1b-1 обратимо ингибирует пиковый ток через hASIC3 каналы (IC<sub>50</sub> 5,5 ± 1,0 мкМ) [101], но его активность значительно уступает активности токсина APETx2 (hASIC3, IC<sub>50</sub> 175 нМ [99]). Причиной низкой активности Hcr 1b-1 может быть небольшое количество заряженных остатков в его последовательности – Lys5 и Asp40-Arg41 [101]. Как было отмечено выше, положительно заряженные аминокислотные остатки токсинов играют ключевую роль во взаимодействии с ASIC каналами. Тем не менее Hcr 1b-1 в два раза более активен, чем токсин Ugr 9-1 (hASIC3, IC<sub>50</sub> 10 ± 0,6 мкМ [98]).

Итак, очевидно, что лиганды ASIC каналов отличаются большим разнообразием структур, однако их общим свойство является наличие остатков Arg и Lys, которые вовлечены во взаимодействие с отрицательно заряженными остатками каналов, необходимыми для активации ASICs [72,81]. Что касается селективности природных токсинов, примечательно, что пептиды змей и пауков ингибируют ASIC1a-содержащие каналы, но не модулируют ASIC3. Исключением является гетеродимер-активатор MitTx $\alpha/\beta$ , который, тем не менее, примерно в 100 раз более активен в отношении ASIC1a каналов. Известные пептиды актиний, напротив, ингибируют ASIC3, не оказывая эффекта на токи гомомерных ASIC1a каналов [72,90].

### 2 Материалы и методы

#### 2.1 Материалы

В работе использовали полихром-1 (политетрафторэтилен) (Олайне, Латвия), целлюлозу КМ-32 (Whatman, Англия), Bio-Rex 70 (Bio-Rad, Richmodn CША), Sephadex C-25 (Amersham Biosciences, CША), бычий сывороточный альбумин (БСА) (Reanal, Beнгрия), ацетонитрил 0 сорта (Криохром, Санкт-Петербург), синапиновую кислоту (Bruker Daltonik, Германия), дитиотреитол (Fluka BioChemika, Kanada), трифторуксусную кислоту (Merck, Германия), хлорид натрия, трис-(гидроксиметил)-аминометан гидрохлорид (Трис-HCl), динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) (Helicon, Россия); 4-винилпиридин, акарбозу, трипсин, свиную панкреатическая α-амилазу (РРА), бромциан (Sigma, США). Все остальные реактивы отечественного производства имели квалификацию «о.с.ч.» или «ч.д.а.», импортные реактивы имели маркировку «для аналитической работы». Все растворы были приготовлены с использованием деионизованной воды (сопротивление 18,2 МОм), полученной на установке Milli-Q system (Millipore, CША).

# 2.2 Оборудование

В работе использовали следующее оборудование: концентратор Concentrator 5301 (Еррепdorf, Германия), центрифуги К-23 и К-24 (Janetzki, Германия), спектрофотомер CE 1021 (Cecil, Великобритания), аналитические весы Kern AGB (Kern, Германия), лиофильную сушку Иней-4 (ИБП РАН, Россия), роторный испаритель Rotavapor R-200 (Büchi, Германия), спектрополяриметр Chirascan-plus (Applied Photophysics, UK), хроматограф Agilent 1100 (Agilent Technologies, CША), времяпролётный масс-спектрометр Ultraflex III MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonik, Германия), масс-спектрометр сверхвысокого разрешения MaXis impact (Bruker Daltonik, Germany), автоматический секвенатор белков Procise 492 cLC (Applied Biosystems, CША), колонки для ВЭЖХ Luna C<sub>18</sub> (10×250 мм), Nucleosil C<sub>18</sub> (4,6×250 мм).

# 2.3 Характеристика объекта исследования

Актинии *H. crispa* были собраны в акватории Южно-Китайского моря у берегов Вьетнама в ходе экспедиционного рейса НИС "Академик Опарин" (2013). Видовая принадлежность образцов актиний была определена сотрудником Национального научного центра морской биологии имени А.В. Жирмунского, к.б.н. Е.Е. Костиной. Биологический материал был заморожен и хранился при минус 20 °C.

#### 2.4 Выделение пептидов из актинии H. crispa

## 2.4.1 Получение водно-этанольного экстракта

Актинии гомогенизировали с тремя объемами 96%-ного этанола при температуре 4 °C в течение 24 ч, гомогенат фильтровали через несколько слоев ткани, а затем центрифугировали при 5000 оборотах в мин в течение 40 мин на центрифуге К-23. Супернатант повторно центрифугировали при 15000 оборотах в мин в течение часа на центрифуге К-24. Супернатант после упаривания этанола лиофилизировали и хранили при минус 20 °C.

# 2.4.2 Гидрофобная хроматография

Гидрофобную хроматографию водно-этанольного экстракта *H. crispa* проводили при 4 °C на колонке (4,8×95 см) с полихромом-1, уравновешенным водой в линейном градиенте концентрации этанола от 0 до 15%, затем в ступенчатом градиенте этанола 20, 30 и 40%. Скорость элюции – 2 мл/мин, объем фракций – 20 мл. Концентрацию белка определяли по методу Лоури на спектрофотометре CE 1021; в качестве стандарта использовали БСА.

## 2.4.3 Ионообменная хроматография

Ионообменную хроматографию пептидов, элюированных гидрофобной при хроматографии, проводили при 4 °C на колонке (25×600 мм) с Bio-Rex 70 (Bio-Rad, Richmodn США), уравновешенной 5 мМ аммонийно-ацетатным буферным раствором (рН 4,5), в линейном градиенте концентрации NaCl (0-1 M) в рабочем буферном растворе, а затем в изократическом режиме. Скорость элюции - 22 мл/60 минут, объем фракций - 5,8 мл. Дальнейшее разделение пептидов полученных фракций проводили при 4 °C на колонке (25×400 мм) с Sephadex C-25 (Amersham Biosciences, США), уравновешенной 100 мМ аммонийноацетатным буферным раствором (pH 4,5), в линейном градиенте pH 5,5–6,5 в рабочем буферном растворе. Скорость элюции – 70 мл/ 60 минут, объем фракций – 7 мл. Концентрацию белка определяли по методу Лоури на спектрофотометре Cecil-1021; в качестве стандарта использовали БСА.

# 2.4.4 Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

ОФ-ВЭЖХ пептидов, полученных в результате гидрофобной или ионнообменной хроматографии, проводили на колонке Luna C<sub>18</sub> (10×250 мм), уравновешенной 10%-ным ацетонитрилом в 0,1%-ной трифторуксусной кислоте (ТФУ), на хроматографе Agilent 1100, США. Элюцию осуществляли в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1%-ной ТФУ согласно [124,125]. Нейротоксическая фракция: в линейном градиенте от 10 до 32% за 22 мин, 32% ацетонитрил в изократическом режиме в течение 18 мин, от 32 до 35% ацетонитрила за 1,5

мин, 35% ацетонитрил в течении 16 мин, от 35 до 40% за 2,5 мин, 40% в течении 8 мин, от 40 до 70% в течении 15 мин. Выделение пептидов Hcr 1b-2 и 1b-3: в линейном градиенте от 10 до 35% за 13 мин, затем 35% ацетонитрил в изократическом режиме в течение 15 мин. Выделение Hcr 1b-4: в линейном градиенте концентрации ацетонитрила от 10 до 40% за 60 мин [124]. Выделение Rp-II и RTX-VI: 10% ацетонитрил в течение 5 мин, затем в линейном градиенте от 10 до 35% за 35 мин. Выделение RTX-III: 10% ацетонитрил в течение 5 мин, затем от 10 до 35% за 25 мин, затем 35% ацетонитрил в течении 10 мин [125]. Скорость элюции – 3 мл/мин. Выход фракций определяли спектрофотометрически по оптическому поглощению элюата при длине волны 214 нм. Для концентрирования и упаривания ацетонитрила после хроматографии использовали Concentrator 5301.

## 2.5 Масс-спектрометрический анализ

Масс-спекрометрический анализ пептидов (молекулярные массы 1000–20000 Да) проводился к.х.н. Анастюком С.Д., сотрудником лаборатории физико-химических методов исследований ТИБОХ ДВО РАН, на времяпролётном масс-спектрометре ULTRAFLEX III MALDI-TOF/TOF, оборудованном азотным лазером (337 нм) с ускоряющим напряжением 25 кВ. В качестве матрицы использовали синапиновую кислоту в концентрации 10 мг/мл в соотношении ацетонитрил-вода 1:1. На подложку наносили 1 мкл матрицы, после высыхания наносили на нее 1 мкл образца пептида и сушили его потоком воздуха, после чего подложку вносили в масс-спектрометр. Масс-спектры фиксировали в линейном и рефлекторном режиме.

# 2.6 Определение и анализ аминокислотной последовательности

Поиск гомологичных аминокислотных последовательностей проводили с помощью алгоритма BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast). Множественное выравнивание последовательностей – с помощью программы Vector NTI Advance 11 (Invitrogen, CША) (https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/life-science/cloning /vector-nti-software.html). Расчет теоретического значения изоэлектрической точки проводили с помощью онлайн сервиса GPMAW-Lite (https://www.alphalyse.com/customer-support/gpmaw-bioinformatics-tool/). Расчет теоретического значения молекулярной массы пептидов производили с помощью веб-сервиса Isotopident (http://education.expasy.org/student\_projects/ isotopident/htdocs/).

### 2.6.1 Алкилирование

Пептиды обрабатывали 6 М гуанидингидрохлоридом в буферном растворе 0,5 М Трис-HCI (pH 8,5) содержащем 2 мМ EDTA, затем добавляли 2 мкл дитиотреитола и инкубировали 4 ч при температуре 40 °C. Тиольные группы остатков Суѕ модифицировали 2 мкл 50%-ного 4винилпиридина в изопропаноле в течение 20 мин при комнатной температуре в темноте. Реакционную смесь разделяли ОФ-ВЭЖХ на колонке Nucleosil C<sub>18</sub> (4,6×250 мм), уравновешенной 10%-ным ацетонитрилом в 0,1%-ной ТФУ в градиенте концентрации ацетонитрила (в 0,1%-ной ТФУ): 10%-ный ацетонитрил в изократическом режиме 30 минут, затем в линейном градиенте ацетонитрила 10–70% в течение 120 минут. Скорость элюции – 0,5 мл/мин.

### 2.6.2 Определение N-концевой аминокислотной последовательности

N-концевые аминокислотные последовательности алкиллированных пептидов определялись к.б.н. Черниковым О.В., заведующим лабораторией химии неинфекционного иммунитета ТИБОХ ДВО РАН, по методу Эдмана на автоматическом секвенаторе белков Procise 492 cLC (Applied Biosystems, США) по программе производителя.

#### 2.6.3 Расщепление бромцианом

Пептиды инкубировали с бромцианом (5 М, 2 мкл) в растворе 70%-ной ТФУ (молярное соотношение пептид/бромциан 1:100) в течение 4 ч при комнатной температуре без доступа света. Реакционную смесь разделяли методом ОФ-ВЭЖХ на колонке Nucleosil C<sub>18</sub> (4,6×250 мм), уравновешенной 10%-ным ацетонитрилом в 0,1%-ной ТФУ в градиенте концентрации ацетонитрила (в 0,1%-ной ТФУ): 10%-ный ацетонитрил в изократическом режиме 30 минут, затем в линейном градиенте ацетонитрила от 10 до 70% в течение 120 минут. Скорость элюции – 0,5 мл/мин.

## 2.6.4 Тандемная масс-спектрометрия

MS/MS спектры молекулярных ионов фрагментов пептидов были получены к.х.н. Дмитренком П.С., заведующим лабораторией физико-химических методов исследований ТИБОХ ДВО РАН, на времяпролётном масс-спектрометре ULTRAFLEX III MALDI-TOF/TOF или на масс-спектрометре сверхвысокого разрешения MaXis impact, оснащенном источником ИЭР как описано в [124,125].

## 2.7 Определение концентрации пептидов по величине оптического поглощения

Концентрацию пептидов с известной аминокислотной последовательностью определяли по величине оптического поглощения в УФ-области спектра в диапазоне длин волн 200–400 нм. Расчет концентрации производили по формуле:  $C = A_{280} \times \varepsilon_{280} \times 1$ , где C – концентрация, моль/л;  $A_{280}$  – оптическая плотность раствора при 280 нм;  $\varepsilon_{280}$  – расчетный молярный коэффициент поглощения при 280 нм, 1 – длина оптического пути (в работе использовали кюветы с длиной оптического пути 1 см). Значения  $\varepsilon_{280}$  для пептидов с известной аминокислотной

последовательностью рассчитывали с помощью программы Vector NTI Advance 11 (Invitrogen, США).

# 2.8 Получение спектров кругового дихроизма

Спектры кругового дихроизма (КД) были получены н.с. Ким Н.Ю., сотрудницей лаборатории физико-химических методов исследований ТИБОХ ДВО РАН. Спектры КД регистрировали на спектрополяриметре Chirascan-plus. Измерения проводили при 20 °C в водном растворе в кварцевых кюветах с длинной оптического пути 0,1 см для пептидной области спектра (190–240 нм) и 1 см – для ароматической (240–320 нм). Калибровку шкалы спектрополяриметра проводили по 0,06%-ному водному раствору аммониевой соли 10-сульфоната-D-камфорной кислоты. Отношение эллиптичностей полос при 192 и 290 нм составляло 2,09. Содержание элементов вторичной структуры белка рассчитывали, используя программный пакет CDPго как описано в [125,126].

## 2.9 Гомологичное моделирование

Теоретические модели пространственных структур молекул Rp-II (UniProt ID: P01534), RTX-III (P30832), Hcr 1b-2 (C0HL52), Hcr 1b-3 (C0HL53) и Hcr 1b-4 (C0HL54) генерировали и анализировали с помощью программ Swiss PDB Viewer (https://spdbv.vital-it.ch/), UCSF Chimera 1.11.2 (https://www.cgl.ucsf.edu/ chimera/) и Discovery studio Visualizer 2019 (BIOVIA, CIIIA) как описано в [125,126]. В качестве прототипов использовали 3D структуры молекул Sh1 (PDB ID: 2Sh1), APETx2 (1WXN и 2MUB), APETx1 (1WQK), и BDS-I (1BDS и 2BDS), полученные из базы данных Protein Data Bank (PDB) (http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do).

## 2.10 Определение биологической активности

## 2.10.1 Определение трипсинингибирующей активности

Для определения трипсинингибирующей активности пептидов фракции к 50 мкл раствора трипсина (100 мкг/1 мл, 0,001 М НСІ) и 250 мкл буферного раствора 0,1 М Трис-НСІ (рН 8) добавляли 50 мкл образца и инкубировали в течение 10 минут при 37 °C. Затем добавляли 250 мкл раствора 1 мМ ВАРNА. Величину оптического поглощеня реакционной смеси измеряли на планшетном спектрофотометре xMark при 410 нм. Измерение проводили относительно контрольного образца, содержащего субстрат и фермент в соответствующей концентрации.

## 2.10.2 Определение способности ингибировать активность α-амилазы

Для определения способности ингибировать активность свиной панкреатической αамилазы (PPA) 10 мкл образца добавляли к 80 мкл 50 мМ натрийфосфатного буферного раствора, содержащего 100 мМ хлорида натрия (pH 7,0) и 1 мкг/мл PPA, и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре. Затем добавляли 2-хлор-4-нитрофенил-α-Dмальтотриозу (1 мМ) и инкубировали в течение 10 минут. Оптическое поглощение измеряли на планшетном спектрофотометре xMark при 405 нм. В качестве положительного контроля использовали акарбозу (1 мг/мл).

#### 2.10.3 Определение максимальной нетоксичной дозы

Для исследования действия пептидов *in vivo* использовали мышей лини CD-1 (виварий ТИБОХ ДВО РАН) весом  $20 \pm 1$  г. Работы с животными проводили в строгом соответствии с законодательством Российской Федерации и положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей». Животных содержали при температуре  $23 \pm 2$  °C, вода и еда *ad libitum*. Каждое животное использовали для эксперимента однократно. Тестируемые пептиды (0,15-300 мкг) растворяли в 100 или 200 мкл физиологического раствора (0,9%-ный NaCl) и вводили экспериментальным животным однократно внутрибрюшинно или внутривенно соответственно. Затем вели наблюдение за группами животных, в ходе которого учитывали их смертность и изменения в поведении и самочувствии. Контрольной группе животных вводили физиологический раствор. Для оценки токсичности определяли максимальную нетоксичную дозу (МНТД) – количество мкг исследуемого пептида на кг веса мыши, которое не вызывало видимых симптомов токсичности в течение 24 часов после введения [124,125,127].

## 2.10.4 Модель кислотоиндуцированной мышечной боли

Модель основана на подсчете корчей (сокращение брюшных мышц, чередующееся с их расслаблением, вытягиванием конечностей и прогибанием спины), вызванных внутрибрюшинным введением уксусной кислоты экспериментальным животным (шесть особей в каждой группе). Тестируемые пептиды и препарат сравнения – анальгин, растворяли в стерильном физиологическом растворе (0,9%-ный NaCl) и вводили животным 100 мкл раствора однократно внутрибрюшинно; контрольной группе животных вводили физиологический раствор. Спустя 60 минут вызывали судороги однократным внутрибрюшинным введением 100 мкл 1%-ной уксусной кислоты и подсчитывали их в течение 15 мин.

#### 2.11 Электрофизиологические исследования

Электрофизиологические исследования проводились доктором С. Пеньером под руководством профессора Я. Титгата в лаборатории токсикологии и фармакологии Католического Университета г. Левен, Бельгия; а также к.б.н. С.Г. Кошелевым под руководством д.х.н. С.А. Козлова в лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов Института биоорганичекой химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Москва, Россия.

# 2.11.1 Экспрессия ASIC каналов и измерение ионных токов

Гомомерные каналы ASIC1a и ASIC3 экспрессировали в мембранах ооцитов лягушки *Xenopus laevis*. Инъекцию 2,5–10 нг мРНК в дефолликулированные ооциты производили под бинокулярным микроскопом MБС-10 (Россия) с помощью микроинъектора Eppendorf 5242 (Германия). Клетки инкубировали 2–3 дня в буферном растворе ND96 (96 мМ NaCl, 2 мМ KCl, 1,8 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ HEPES, pH 7,4) с добавлением гентамицина 50 мкг/мл, при температуре 19 °C, затем инкубировали до пяти дней при температуре 15–16 °C.

Измерение ионных токов через каналы проводили при частоте 100 Гц в условиях фиксации мембранного потенциала методом двухэлектродной фиксации, используя усилитель GeneClamp 500 (Axon Instruments, CIIIA), в рабочей камере со свободным объемом 75 мкл, в ламинарном потоке раствора ND96 (pH 7,8) со скоростью 1 мл/мин. ASIC1a и ASIC3 каналы активировали резким изменением pH раствора от 7,8 (буферный раствор 5 мМ HEPES) до 5,5 (10 мМ MES) и 4,0 (10 мМ CH<sub>3</sub>COOH). Для уменьшения неспецифического связывания с каналом пептиды растворяли в буферных растворах, содержащих 0,1%-ный БСА. Аппликацию тестируемого образца начинали за 15 с до подачи в измерительную камеру активационного буферного раствора и продолжали в его присутствии. Измерения осуществляли в стерильной среде ND96, с добавлением гентамицина 50 мкг/мл и пирувата 5 мМ. Обработку полученных результатов проводили с помощью программы Origin 7.0 (Microcal Software, CIIIA) как описано в [124,126].

# 2.11.2 Экспрессия Nav каналов и измерение ионных токов

Каналы Na<sub>v</sub> (hNa<sub>v</sub>1.1, rNa<sub>v</sub>1.2, rNa<sub>v</sub>1.3, rNa<sub>v</sub>1.4, hNa<sub>v</sub>1.5, mNa<sub>v</sub>1.6, rNa<sub>v</sub>1.8, BgNa<sub>v</sub>1, VdNa<sub>v</sub>1 и регуляторные субъединицы r $\beta$ 1, h $\beta$ 1, TipE) экспрессировали в мембранах ооцитов *Xenopus laevis*. Инъекцию 1 нг мРНК в дефолликулированные ооциты производили с помощью микроинъектора (Drummond Scientific Company, США). Клетки инкубировали 1–4 дня в буферном растворе ND96 (pH 7,4) с добавлением гентамицина 50 мкг/мл.

Измерение прохождения ионных токов через каналы проводили при частотах дискретизации и фильтрации, равных 1 кГц и 20 кГц, с помощью 4-полярного фильтра Бесселя, используя усилитель GeneClamp 500 (Axon Instruments, США) и микроэлектроды, имеющие сопротивление 0,8 и 1,5 мОм, заполненные 3 М КСl. Измерения проводили при комнатной температуре 18–20 °C в стерильном буферном растворе ND96 (pH 7,4). Для вычитания токов утечки использовали протокол P/4. Экспериментальные данные были получены и проанализированы с использованием программ pClamp Clampfit 10.0 (Molecular Devices, CША) и Origin 7.5 (OriginLab, CША) как описано в [125].

# 3 Результаты и обсуждение

Вид актиний *H. crispa* распространен в Западной Индо-Пацифике от восточного побережья Африки до Полинезии и от южного побережья Японии до берегов Австралии. Животные обитают на глубине от 3 до 40 метров, прикрепляясь к твердым субстратам, включая коралловые рифы, и питаются продуктами фотосинтеза одноклеточных симбиотических водорослей зооксантелл, а также обездвиживают и захватывают щупальцами мелких беспозвоночных, мальков и рыб. Актинии *H. crispa* известны как идеальные симбионты для рыб рода Amphiprion и потому пользуются популярностью у аквариумистов. Большое количество симбиотических видов является отличительной особенностью актиний этого вида и может быть связано с относительно низкой токсичностью их яда (гемолитической активностью, острой токсичностью и нейротоксичностью) по сравнению с ядами актиний родов Entacmaea, Macrodactyla, Stichlodactyla и Cryptodendrum, а также других видов актиний рода Heteractis [9,128].

Состав яда *H. crispa* мало изучен, по сравнению с ядами других представителей семейства Stichodactylidae [9]. В результате исследования транскриптома *H. crispa* были обнаружены нуклеотидные последовательности, кодирующие цитолизины (актинопорины и фосфолипазы A<sub>2</sub>), металлопротеазы, токсины-модуляторы натриевых (NaTxs) и калиевых каналов (KTxs, структурные типы I–V), включая ингибиторы протеаз Кунитц-типа и др. Наиболее широко представленные в транскиптоме металлопротеазы и токсины KTxs типов II и III отличались высоким уровнем экспрессии. Представители двух уникальных структурных групп токсинов актиний, NaTxs и KTxs типа III, обнаружены во всех тканях актинии (щупальца, мезентерий, тело); KTxs типа I и цитолизины входят в состав ядовитого секрета щупалец *H. crispa*, однако в клетках тела актиний наблюдается удивительно низкий уровень экспрессии генов, кодирующих токсины [9].

За последние тридцать пять лет сотрудниками лаборатории химии пептидов ТИБОХ ДВО РАН из водно-этанольного экстракта актинии *H. crispa* (= *Radianthus macrodactylus*) был выделен ряд биологически активных пептидов, принадлежащих различным структурным классам: актинопорины, пептиды Кунитц-типа, нейротоксины и APETx-подобные пептиды. Установлено, что пептиды Кунитц-типа и актинопорины *H. crispa* формируют комбинаторные библиотеки, включающие 70 [7] и 47 [8] представителей соответственно, что делает ядовитый секрет этой актинии весьма интересным и перспективным объектом исследования. Было установлено, что четыре нативных актинопорина, RTX-A [129], RTX-S, RTX-G [130] и RTX-S2 [131], оказывают цитолитическое действие на эритроциты, яйцеклетки морского ежа, ряд опухолевых клеток [132], а также обладают мембранотропным действием по отношению к

модельным мембранам (липосомы и БЛМ) [5]. Гибель клеток, вызываемая актинопоринами, обусловлена их способностью формировать белок-липидные поры в клеточных мембранах, что приводит к их лизису. Нативные полифункциональные пептиды Кунитц-типа, In-IV [133], InhVG [134], APHC1, APHC2, APHC3 [135,136], а также рекомбинантные аналоги пептидов, последовательности которых были установлены путем секвенирования кДНК (HCRG21 [137]), проявляют анальгетическое и противовоспалительное действие *in vivo*. Они не только ингибируют сериновые протеазы, но также блокируют ванилоидный рецептор TRPV1, отвечающий за терморегуляцию и передачу болевых стимулов, вызванных воспалением и другими патологическими состояниями [5].

Установлено, что выделенные ранее нейротоксины RTX-I – RTX-V [138–141], принадлежат структурному типу 2 и являются высоко токсичными как для млекопитающих, так и для членистоногих, благодаря способности активировать потенциал-зависимые Na<sub>V</sub> каналы. Единственный представитель APETx-подобных пептидов, продуцируемый *H. crispa*, пептид рі-AnmTx Hcr 1b-1, гомологичный токсинам APETx1 – APETx4 из *A. elegantissima* и обладающий анальгетической активностью в модели кислотоиндуцированной мышечной боли, ингибирует протон-чувствительные ионные каналы ASIC3 [101]. Таким образом, актиния *H. crispa* является перспективным источником биологически активных соединений, модуляторов различных ионных каналов и ионотропных рецепторов.

## 3.1 Протеомный анализ нейротоксической фракции ядовитого секрета H. crispa

На сегодняшний день наиболее исследованы разнообразие и свойства отдельных компонентов ядов, продуцируемых актиниями семейства Actiniidae [2,9,142], в то время как токсины представителей семейства Stichodactylidae, в частности актиния *H. crispa*, остаются практически неизученными. В настоящей работе методами ОФ-ВЭЖХ и МАЛДИ массспектрометрии мы проанализировали разнообразие пептидов, содержащихся в 20%-ной водноэтанольной фракции *H. crispa*, а также определили их биологическую активность [124].

Водно-этанольная 20%-ная фракция была получена гидрофобной хроматографией пептидных компонентов, извлеченных 70%-ным этанолом из гомогенизированных актиний. В качестве сорбента использовали Полихром-1, который связывает гидрофобные молекулы, позволяя отделить их от гидрофильных компонентов экстракта, в том числе солей, содержащихся в экстракте в большом количестве. Элюирование солей, актинопоринов и фосфолипаз осуществляли водой, а токсины и ингибиторы протеаз элюировали в ступенчатом градиенте концентрации этанола от 15 до 40% (Рисунок 22 А). Пептиды нейротоксической фракции, элюированные 20%-ным этанолом, имеющие, согласно данным МАЛДИ масс-

спектрометрии, молекулярную массу от 4500 до 6000 Да, проявили анальгетическую активность *in vivo* в модели кислотоиндуцированной мышечной боли.



А – Хроматографию проводили на колонке (48×95 см) с полихромом-1, уравновешенным водой.
Элюцию осуществляли в градиенте концентрации этанола (см. раздел методы, здесь и далее градиент показан на рисунке). Скорость элюции – 120 мл/час, объем фракций – 20 мл. Б – Хроматографию проводили на колонке Luna С<sub>18</sub> (10×250 мм), уравновешенной 10%-ным ацетонитрилом в 0,1%-ной ТФУ, в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1%-ной ТФУ. Скорость элюции – 3 мл/мин. Отмечены границы объединения фракций

Рисунок 22 – Профили элюции пептидов, полученных при гидрофобной хроматографии экстракта *H. crispa*, и ОФ-ВЭЖХ пептидов, содержищихся в нейротоксической фракции

В результате дальнейшего фракционирования пептидов, содержащихся в нейротоксической фракции, методом ОФ-ВЭЖХ было получено тридцать белковых фракций (Рисунок 22 Б). Для содержащихся в них пептидов были определены молекулярные массы и биологическая активность (токсичность, способность ингибировать трипсин, α-амилазу или

токи через ASIC3 каналы) (Таблица 2). Масс-спектрометрический анализ показал наличие 159ти пиков, соответствующих содержащимся в нейротоксической фракции пептидам с молекулярными массами в диапазоне от 2678 до 11854 Да. Основными компонентами нейротоксической фракции оказались пептиды с массами 4500–4700, 5000–5500 и 6000–7000 Да, которые, учитывая результаты тестирования биологической активности (Таблица 2), повидимому, представляют собой APETx-подобные пептиды, способные ингибировать ASIC3 (4500–4700 Да) [99], гомологи ингибиторов панкреатической  $\alpha$ -амилазы (PPA), хелиантамида (*S. helianthus*) [143] и магнификамида (*Heteractis magnifica*) [144,145] (4700 Да), нейротоксинымодуляторы Na<sub>V</sub> каналов типов 1 и/или 2 (5000–5500 Да) [1], а также ингибирующие трипсин пептиды Кунитц-типа (6000–7000 Да) [146].

Фракция	Токсичность, мг/кг *	Трипсин- ингибирующая активность	РРА- ингибирующая активность	Ингибирование hASIC3, (1 - (Ib/Icontrol))%	m/z
1	H.o.	+++	+++	Н.о.	3824,0; <u>3980,5</u> ;4122,6; 4528,1; <u>4817,7</u> ;5230,9; <u>5374,9</u> ; 6024,8; 6943,4; 7609,1
2	H.o.	+++	+++	H.o.	3980,9; 4126,0; 4758,6; 4816,8; 5377,5; <u>5444,1</u> ; 6022,6; 6940,7; 7604,3; 8211,2
3	H.o.	+++	+++	-	2362,9; 4536,1; <u>4727,0</u> ; 4949,0; 5258,0; 5441,5; 5570,0; 6104,0
4	H.o.	+++	-	-	6073,9; 6328,1; <u>7260,9;</u> 8691,5; 10228,8; 11854,2
5	Н.о.	+++	+++	-	3978,0; <u>4816,2;</u> 5360,5; 5918,7; 6020,5; <u>6944,6</u>
6	Н.о.	+++	+++	-	4535.0; <u>4726.0;</u> 4989.0; 5259.0; <u>5376.0;</u> 5499.0; 5552.0; 6104.0
7	H.o.	+++	+++	-	3978,7; <u>4758,4;</u> 4815,3; 4944,7; <u>5378,9;</u> 5496,3; 5571,9; 6105,9

Таблица 2 – Биологическая активность и молекулярная масса пептидов нейротоксической фракции *H.* crispa (Рисунок 22 Б)

Продолжение	таблицы	2.
-------------	---------	----

Фракция	Токсичность, мг/кг *	Трипсин- ингибирующая активность	РРА- ингибирующая активность	Ингибирование hASIC3, (1 - (Ib/Icontrol))%	m/z
8	H.o.	++	+++	-	2628,3; 3064,5; 4152,3; 4535,4; 4727,8; 5138,9; 5259,2; 5374,9; 5537,5; 6106,8
9	0,01	-	+++	-	<u>4774,0;</u> 5007,4;5381,7
10	Н.о.	++	+	_**	4752,1; 5002,7; 5396,8; <u>5440,9;</u> 5652,0; 6098,1
11	Н.о.	+++	+	_**	4666,0; <u>4727,7;</u> 5008,3; 5260,3; 5441,6; <u>6104,3;</u> 6312,1
12	H.o.	++	-	-	4668,6; <u>4730,9</u> ;4955,3; 5087,4;5182,6; 5392,3; 5557,3; 6109,4
13	б	+	+	-	4665,3; <u>4728,9;</u> 4934,0; 4991,7; 5190,9; 5263,4; 5378,6; 6104,6
14	Н.о.	+	+	-	4441,3; 4740,3; 4986,2, 5282,2; <u>5374,5;</u> 5496,4; 6101,5
15	H.o.	-	++	-	<u>4543,6; 4599,8;</u> 4698,1; 5385,0
16	Н.о.	+	-	-	<u>4538,5; 4606,5;</u> <u>4711,6;</u> 5380,8, 6218,1; 6278,7
17	Н.о.	++	-	H.o.	<u>4535,3; 4593,9;</u> <u>4694,4;</u> 4903,2, 5115,1; 5375,1; 6210,5
18	Н.о.	++	+++	-	<u>4487.5; 4603.4;</u> <u>4713.5;</u> 5382.3; 6056.4
19	H.o.	-	-	-	<u>4601,7;</u> 4716,6; 4813,6; 5129,1; 5375,9
20	10	-	-	14	<u>4701,9</u>
21	H.o.	-	-	Н.о.	<u>5285,7</u>

Продолжение таблицы 2.	
------------------------	--

Фракция	Токсичность, мг/кг *	Трипсин- ингибирующая активность	РРА- ингибирующая активность	Ингибирование hASIC3, (1 - (Ib/Icontrol))%	m/z
22	H.o.	-	-	Н.о.	<u>4441,6;</u> <u>4526,0;</u> 4736,5; 5382,2
23	10	-	-	64	<u>4522,4;</u> 4700,4
24	10	-	-	31	<u>4523,6;</u> 4726,4
25	10	-	-	47	<u>4518,5;</u> 4749,3
26	10	-	-	50	<u>4529,6</u> ; 4707,6
27	10	-	-	Н.о.	<u>4459,6; 4517,3;</u> 4690,3; 5376,5
28	10	-	-	H.o.	4451,8; <u>4515,8;</u> 4695,7
29	10	-	-	H.o.	4454,3; <u>4517,9;</u> 4697,1
30	10	-	-	H.o.	4464,6; <u>4522,4;</u> 4701,5; 4828,2

#### Примечания

1. Токсичность и ингибирующая активность некоторых фракций в отношении ASIC3 каналов не определялась из-за недостаточного количества материала (H.o.).

 \*В качестве меры токсичности пептидов использовали максимальную нетоксичную дозу (МНТД). За величину МНТД принимали количество (мг) исследуемого пептида на кг веса мыши, которое не вызывало видимых симптомов токсичности в течение 24 часов после введения [127].

3. \*\* Фракции, которые содержали пептиды, проявившие мембранолитическую активность

Пептиды с молекулярными массами от 4000 до 5000 Да оказались превалирующими компонентами и содержались во всех исследованных фракциях кроме фракции 4, они были классифицированы, в соответствии с результатами тестирования активности, как APETх-подобные пептиды или ингибиторы PPA (Таблица 2). APETх-подобные пептиды, основные компоненты фракций 20, 23–26, в концентрации ~0,4 мг/мл достоверно ингибировали от 14 до 64% амплитуды тока через протон-чувствительные ASIC3 каналы, активированные резким снижением pH от 7,4 до 4,0. Пептиды фракций 20, 23–26 не обладали способностью ингибировать трипсин или PPA и не были токсичны для мышей даже в концентрации 10 мг/кг (Таблица 2).

Из тридцати протестированных фракций (Рисунок 22 Б) тринадцать содержало ингибиторы PPA (1–3, 5–11, 13–15 и 18). Первый пептид, обладающий способностью ингибировать  $\alpha$ -амилазу, хелиантамид, был идентифицирован относительно недавно и является представителем нового структурного класса токсинов актиний, хотя входит в уже известую группу гомологов  $\beta$ -дефензинов, наряду с нейротоксинами и APETx-подобными пептидами

[143]. В настоящее время интерес к поиску новых активных ингибиторов  $\alpha$ -амилаз связан с участием последних в процессах катаболизма углеводов. Так как именно  $\alpha$ -амилазы осуществляют первые этапы гидролиза полисахаридов в процессе пищеварения, ингибирование их активности позволяет избежать появления побочных эффектов, характерных для низкомолекулярных ингибиторов  $\alpha$ -глюкозидазы, которые в настоящее время используются в терапии сахарного диабета [143,145]. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что актиния *H. crispa* является перспективным источником востребованных фармакологических препаратов – новых ингибиторов  $\alpha$ -амилаз.

Пептиды, ингибирующие трипсин, были обнаружены во фракциях 1-8, 10-14 и 16-18. Наличие значительного числа фракций с трипсинингибирующей активностью, Кунитц-типа (6000-7000 предположительно содержащих пептиды Дa). объясняется существованием мультигенного семейства, кодирующего обширную (более 70 пептидов) комбинаторную библиотеку пептидов [7]. Формируют ли таким же образом комбинаторные библиотеки ингибиторы α-амилазы и АРЕТх-подобные пептиды, еще неизвестно.

Пептиды с молекулярной массой 5000–5500 Да, идентифицированные нами как нейротоксины, присутствовали в двадцати одной фракции (1–3, 5–19, 21, 22 и 27) (Таблица 2). Благодаря способности активировать Na<sub>V</sub> каналы, именно нейротоксины обусловливают нейрои кардиотоксичность, характерные для ядовитого секрета актиний [1,50]. К сожалению, из-за отсутствия необходимого количества материала нам не удалось определить токсичность компонентов большинства фракций (Таблица 2). Однако пептиды фракции 9 оказались чрезвычайно токсичными для мышей. В концентрации свыше 0,01 мг/кг они вызывали судороги и гибель экспериментальных животных. Согласно данным масс-спектрометрии и деградации по Эдману, основным компонентом фракции 9 является высоко токсичный для млекопитающих нейротоксин RTX-III (LD<sub>50</sub> 2,5 мкг/кг), выделенный ранее из *H. crispa* T.A. Зыковой и др. [140].

распределения молекулярных Анализ масс пептидов, присутствовавших В нейротоксической фракции *H. crispa*, показал, что суммарное содержание APETx-подобных пептидов и ингибиторов РРА было в два раза выше, чем содержание нейротоксинов, и в четыре раза выше, чем содержание ингибиторов трипсина (Рисунок 23 А). Эти данные согласуются с результатами исследования актиний Bunodosoma cangicum (Рисунок 23 Б) и Bunodosoma granulifera [142], несмотря на то, что *H. crispa* и актинии рода Bunodosoma принадлежат к разным семействам (Stichodactylidae и Actiniidae). АРЕТх-подобные пептиды также были обнаружены при исследовании протеома и/или транскриптома таких представителей семейства Actiniidae как A. viridis [147], A. sulcata [148], Cnidopus japonicus [149] и A. elegantissima [6]. В подавляющем большинстве случаев APETx-подобные пептиды составляли значительную часть

компонентов яда актиний, наряду с нейротоксинами и пептидами Кунитц-типа. В то же время в нейротоксической водной фракции из *S. helianthus* содержание APETx-подобных пептидов было незначительным, а на транскриптомном уровне эти пептиды не были обнаружены [142], так же как и в транскриптомах актиний *Stichodactyla haddoni* [150] и *Stichodactyla duerdeni* [151], хотя актинии рода Stichodactyla и *H. crispa* составляют одно семейство. Таким образом, в настоящее время *H. crispa* является единственным представителем семейства Stichodactylidae, для которого было показано высокое содержание APETx-подобные пептидов на уровне протеома.



Рисунок 23 – Гистограммы распределения молекулярных масс пептидов водно-этанольной нейротоксической фракции *H. crispa* [124] (А) и водной нейротоксической фракции актинии *B. cangicum* [142] (Б)

# 3.2 Выделение пептидов *H. crispa*

#### 3.2.1 Выделение АРЕТх-подобных пептидов

Пептиды мажорных фракций 20, 23 и 24 (Рисунок 22 Б), ингибировавшие токи через ASIC3 каналы, были подвергнуты дальнейшей очистке (Рисунки 24-26). В результате повторной ОФ-ВЭЖХ было выделено три индивидуальных пептида, названных, согласно «целесообразной номенклатуре» [11], *π*-AnmTX Hcr 1b-2 (моноизотопная молекулярная масса 4518,96 Да), *π*-AnmTX Hcr 1b-3 (4519,94 Да) и *π*-AnmTX Hcr 1b-4 (4693,91 Да), (далее Hcr 1b-2 – Hcr 1b-4) [124]. Ранее из 15%-ной водно-этанольной фракции *H. crispa* был выделен пептид Hcr 1b-1, ингибирующий ASIC3 [101]. Схема его выделения включала, помимо гидрофобной хроматографии, еще пять стадий, в том числе ионообменную хроматографию, гельпроникающую хроматографию и ОФ-ВЭЖХ. Нам удалось максимально упростить схему

выделения пептидов, сократив ее до трех стадий, гидрофобной хроматографии и двух стадий ОФ-ВЭЖХ [124].



Хроматографию проводили на колонке Luna C<sub>18</sub> (10×250 мм), уравновешенной 10%-ным ацетонитрилом в 0,1%-ной ТФУ, в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1%-ной ТФУ. Скорость элюции – 3 мл/мин. Отмечены границы объединения фракций. Во вставке показан ИЭР масс-спектр, приведена моноизотопная молекулярная масса пептида Hcr 1b-4

Рисунок 24 – Профиль элюции пептидов фракции 20, полученный в результате ОФ-ВЭЖХ (Рисунок 22 Б)



Условия хроматографии см. рисунок 24. Отмечены границы объединения фракций. Во вставке показан ИЭР масс-спектр, приведена моноизотопная молекулярная масса пептида Hcr 1b-2

Рисунок 25 – Профиль элюции пептидов фракции 23, полученный в результате ОФ-ВЭЖХ (Рисунок 22 Б)



Условия хроматографии см. рисунок 24. Отмечены границы объединения фракций. Во вставке показан ИЭР масс-спектр, приведена моноизотопная молекулярная масса пептида Hcr 1b-3

Рисунок 26 – Профиль элюции пептидов фракции 24, полученный в результате ОФ-ВЭЖХ (Рисунок 22 Б)

# 3.2.2 Выделение и характеристика нейротоксинов H. crispa

В период с 1985 по 1991 гг. Т.А. Зыковой и др. из актинии *H. crispa* было выделено пять нейротоксинов, RTX-I – RTX-V [138–141]. Используя ранее разработанную схему выделения, включающую гидрофобную, катионообменную хроматографию и ОΦ-ВЭЖХ, мы получили из 70%-ного водно-этанольного экстракта *H. crispa* три нейротоксина, RTX-III, RTX-VI и Rp-II (альтернативное название δ-SHTX-Hcr1f) [125]. Катионообменная хроматография пептидов, элюированных 20%-ным этанолом с Полихрома-1, на носителе Bio-Rex 70 позволила получить пять фракций (Рисунок 27).



Компоненты фракции 2, наиболее обогащенной, согласно данным масс-спектрометрии, пептидами с молекулярной массой 5000–5400 Да, были подвергнуты катионообменной хроматографии на колонке с SP-Sephadex C-25 (Рисунок 28). Для получения индивидуальных пептидов, содержащихся во фракциях 1 и 3, использовали ОФ-ВЭЖХ. Из фракции 1 было выделено два нейротоксина; пептид, позднее идентифицированный как нейротоксин Rp-II (5287,25 Да), ранее обнаруженный в актинии *H. magnifica* [152,153]; и новый пептид RTX-VI (5240,21 Да). Основным компонентом фракции 3 оказался ранее выделенный из *H. crispa* нейротоксин RTX-III (5378,33 Да) [140] (Рисунки 29-30).



Профиль элюции пептидов на колонке Luna C18 (10×250 мм), уравновешенной 10%-ным ацетонитрилом в 0,1%-ной ТФУ, в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1%-ной ТФУ. Скорость элюции – 3 мл/мин. Отмечены границы объединения фракций. Во вставке показан ИЭР масс-спектр, приведена средняя молекулярная масса пептида Rp-II

Рисунок 29 – Финальная стадия выделения нейротоксина Rp-II



Условия хроматографии см. рисунок 29. Отмечены границы объединения фракций. Во вставках показаны ИЭР масс-спектры, приведены средние молекулярные массы пептидов RTX-III и RTX-VI

Рисунок 30 – Финальная стадия выделения нейротоксинов RTX-III (А) и RTX-VI (Б)

# 3.3 Определение аминокислотной последовательности пептидов H. crispa

Определение аминокислотной последовательности природных токсинов белковой природы является одним из необходимых условий их применения в качестве инструментов исследования молекулярных мишеней или основы для дизайна медицинских препаратов. Известно, что большинство токсинов актиний, включая ранее полученный из H. crispa ингибитор ASIC3 каналов, Hcr 1b-1 [101], а также нейротоксины RTX-I – RTX-V [138–141], содержат шесть остатков цистеина, которые образуют три дисульфидные связи. Поэтому для восстановления дисульфидных связей все полученные пептиды инкубировали с дитиотреитолом, а затем алкилировали образовавшиеся сульфгидрильные группы 4винилпиридином. Алкилированные пептиды выделяли из реакционной смеси с помощью ОФ-ВЭЖХ. Масс-спектрометрический анализ показал, что молекулярная масса модифицированных пептидов увеличилась на 636 Да, следовательно, все дисульфидные связи в молекулах пептидов были восстановлены, а остатки Cys алкилированы.

Аминокислотные последовательности алкилированных пептидов были определены комбинацией методов автоматического секвенирования по Эдману и тандемной массспектрометрии. Масс-спектрометрическое секвенирование позволяет эффективно устанавливать аминокислотные последовательности новых пептидов [154]. Преимуществами этого метода перед классическим секвенированием по Эдману являются высокая скорость и низкая стоимость. В данном случае мы использовали широко известный подход «bottom-up», который заключается в предварительном расщеплении пептида на более мелкие фрагменты,

67

разделении реакционной смеси с помощью ВЭЖХ и анализе продуктов методом тандемной масс-спектрометрии. Масс-спектрометрическое секвенирование пептидов проводят на основании MC/MC спектра, который получают при фрагментации протонированных молекул пептидов. Существует большое количество методов стимулирования разрыва полипептидной цепи, однако наибольшее количество MC/MC спектров секвенированных пептидов было получено с помощью диссоциации, активированной соударениями (ДАС). Спектры ДАС содержат, в основном, пики ионов серий b и у (Рисунок 31 А); основываясь на разнице масс этих фрагментарных ионов устанавливают аминокислотную последовательность [154].

### 3.3.1 Определение аминокислотной последовательности АРЕТх-подобных пептидов

Частичные N-концевые последовательности пептидов Hcr 1b-2 и Hcr 1b-3 (39 a.o.), а также Hcr 1b-4 (33 а.о.) были установлены деградацией по методу Эдмана. С-концевые аминокислотные последовательности были идентифицированы на основании анализа тандемных масс-спектров (МС/МС) положительных ионов фрагментов пептидов, полученных в результате расщепления бромцианом алкилированных пептидов Hcr 1b-2 – Hcr 1b-4 [124]. Поскольку фрагментации ионов дисульфидсодержащих пептидов практически не происходит, для получения информативных спектров Hcr 1b-2 – Hcr 1b-4 пептиды алкилировали 4винилпиридином, а затем обработали бромцианом для получения двух (Hcr 1b-2, Hcr 1b-3) или трех (Hcr 1b-4) коротких фрагментов, MC/MC спектры которых использовали для установления С-концевых аминокислотных последовательностей пептидов. На рисунке 31 Б показан фрагмент ДАС-спектра трехзарядного молекулярного иона [M+3H]<sup>3+</sup> С-концевого фрагмента (17–41 а.о.) алкилированного пептида Hcr 1b-2. Спектр содержал пики ионов  $y_{1}^{+}$  и  $y_{2}^{+}$  с массами 147,1116 и 275,2095 Да соответственно, свидетельствующие о разрыве связей между 40-м и 39м, 40-м и 41-м аминокислотными остатками. Эти значения соответствовали теоретическим массам ионов ( $y_{11}^+$  147,1134 Да и  $y_{22}^+$  275,2083 Да), образующимся при разрыве пептидной связи Lys40-Lys41. Таким образом, аминокислотная последовательность пептида Hcr 1b-2 идентична последовательности Hcr 1b-1 на 95% и отличается от нее лишь наличием двух остатков Lys на С-конце пептида (Рисунок 32). Для определения последовательности пептида Hcr 1b-3 использовали аналогичный подход, показав, что Hcr 1b-2 и Hcr 1b-3 различаются единственной аминокислотной заменой Asn22Asp (Рисунок 32).

На рисунке 33 приведен ДАС-МС/МС спектр однозарядного молекулярного иона [M+H]<sup>+</sup> С-концевого фрагмента (35–41 а.о.) пептида Hcr 1b-4, содержащий пики ионов а-, b-, уи z-серий, которые позволили установить С-концевую аминокислотную последовательность пептида Hcr 1b-4. Поскольку однозначно идентифицировать природу остатков Leu и Ile на основании MC/MC не всегда возможно, основываясь на высокой гомологии APETx-подобных пептидов, мы пришли к выводу, что в позиции 36 находится Ile (Рисунок 32). Пептид Hcr 1b-4 выделяется среди своих ближайших гомологов, токсинов *H. crispa*, девятью аминокислотными заменами. Его идентичность с ними составляет лишь 78% (Рисунок 32).



А – Фрагментация полипептидной цепи [154]. Б – ИЭР МС/МС спектр [М+3H]<sup>3+</sup> иона С-концевого фрагмента пептида Hcr 1b-2 (17LAGCPNGYGYNLSCPYGIC CVKK41). Ионы y<sub>1</sub><sup>+</sup> и y<sub>2</sub><sup>+</sup> иллюстрируют разрыв пептидных связей Val39-Lys40-Lys41

Рисунок 31 – Определение С-концевой последовательности пептида Hcr 1b-2

Пептиды Нст 1b-2 – Нст 1b-4 являются гомологами токсинов *A. elegantissima*, APETx1 [155], APETx3 [121] и APETx4 [156], ингибирующих токи  $K_V$ 11.1, Na<sub>V</sub> и  $K_V$ 10.1 каналов соответственно (идентичность 54–56%). При этом идентичность аминокислотных последовательностей пептидов *H. crispa* и токсина APETx2 [99], единственного ингибитора ASIC3 каналов, выделеного из *A. elegantissima*, немного ниже, 46–48%. Самая низкая гомология последовательностей наблюдается между пептидами *H. crispa* и APETx-подобными пептидами BDS-I и BDS-II из актинии *Anemonia sulcata*, модуляторами  $K_V$ 3 и Na<sub>V</sub>1.7 каналов [157,158] (идентичность 39%).

Особенностью АРЕТх-подобных пептидов *H. crispa* является низкое содержание осно́вных аминокислотных остатков (Рисунок 32), играющих, согласно литературным данным, определяющую роль в образовании комплекса токсина с ASIC каналом, поверхность которого заряжена отрицательно [81,90]. От гомологичных АРЕТх-подобных токсинов пептиды *H. crispa* отличает наличие заряженных остатков Lys (Hcr 1b-1 – Hcr 1b-3) или Asp (Hcr 1b-4) в положении 5 аминокислотной последовательности, Arg в положении 19 (Hcr 1b-4) и пары положительно заряженых С-концевых остатков (Рисунок 32). Известно, что наиболее важным для сохранения ингибирующей активности токсина APETx2 является остаток Arg17, окруженный кластером гидрофобных остатков: Thr2, Phe15, Tyr16, Phe33 и Ley34 [118]. Большинство этих гидрофобных остатков являются консервативными для APETx-подобных пептидов, однако их роль во взаимодействии молекул Hcr 1b-1 – Hcr 1b-4 с ASIC каналами пока остается неясной, ввиду аминокислотной замены Leu17Arg, отличающей пептиды *H. crispa* от токсина APETx2 (Рисунок 32).

Hcr 1b-1	GTPCKCHGYIGVYWFMLAGCPNGYGYNLSCPYFLGICCVDR-	100
Hcr 1b-2	GTPCKCHGYIGVYWFMLAGCPNGYGYNLSCPYFLGICCVKK-	95
Hcr 1b-3	GTPCKCHGYIGVYWFMLAGCPDGYGYNLSCPYFLGICCVKK-	93
Hcr 1b-4	GTPCDCYGYTGVYWFMLSRCPSGYGYNLSCHYFMGICCVKR-	78
crassicorin-I	GASCDCHPFVGTYWFGISNCPSGHGYRKKCASFFGVCCVK	48
APETx1	GTTCYCGKTIGIYWFGTKTCPSNRGYTGSCGYFLGICCYPVD	54
APETx2	GTACSCGNSKGIYWFYRPSCPTDRGYTGSCRYFLGTCCTPAD	49
APETx3	GTPCYCGKTIGIYWFGTKTCPSNRGYTGSCGYFLGICCYPVD	56
APETx4	GTTCYCGKTIGIYWFGKYSCPTNRGYTGSCPYFLGICCYPVD	56
BDS-I	AAPCFCSGKPGRGDLWILRGTCPGGYGYTSNCYKWPNICCYPH-	39
BDS-II	AAPCFCSGKPGRGDLWILRGTCPGGYGYTSNCYKWPNICCYPH-	39

идент.,%

Рисунок 32 – Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей APETxподобных пептидов: Hcr 1b-1 (UniProt ID: P0DL87), Hcr 1b-2 (UniProt ID: C0HL52), Hcr 1b-3 (C0HL53) и Hcr 1b-4 (C0HL54) из *H. crispa*, crassicorin-I (ARQ30160) из *Urticina crassicornis*, APETx1 (P61541), APETx2 (P61542), APETx3 (B3EWF9) и APETx4 (C0HL40) из *A. elegantissima*, BDS-I (P11494) и BDS-II (P59084) из *A. sulcata* 



Присутствие одной или двух этилпиридиловых групп в составе пептида отмечено \* или \*\* соответственно. Сверху показаны идентифицированные фрагменты аминокислотной последовательности

Рисунок 33 – МАЛДИ МС/МС спектр [M+H]<sup>+</sup> иона С-концевого фрагмента пептида Hcr 1b-4 (35GICCVKR41)

### 3.3.2 Определение аминокислотной последовательности нейротоксинов

Для определения аминокислотных последовательностей трех выделенных нейротоксинов их дисульфидные связи восстанавливали дитиотреитолом и остатки Cys алкилировали 4-винилпиридином; затем продукты реакции разделяли ОФ-ВЭЖХ и секвенировали методами автоматической деградации по Эдману или тандемной массспектрометрии. Последовательность 48 а.о. нейротоксина *H. crispa* с молекулярной массой 5287,25 Да (альтернативное название δ-SHTX-Hcr1f), определенная методом деградации по Эдману, оказалась идентична последовательности молекулы Rp-II из H. magnifica [153]. Однако выделенный нами из *H. crispa* пептид, согласно данным масс-спектрометрии, имеет аминогруппу на С-конце, о наличии которой ранее не было известно (Рисунок 34) [125]. Установлено, что нейротоксины претерпевают пострансляционную модификацию, в результате которой происходит отщепление С-концевого остатка Gly и амидирование Lys 48 [159]. Так, показано, что амидированный С-концевой остаток имеют также два нейротоксина 2 типа, SHTX-IV (S. haddoni) [159] и Sh1 (S. helianthus) [160] (Рисунок 34).

SHTX-IV	AACKCDDDGPDIRSATLTGTVDFWNCNEGWEKCTAVYTAVASCCRKKK-NH <sub>2</sub>
Sh1	AACKCDDEGPDIRTAPLTGTVDLGSCNAGWEKCASYYTIIADCCRKKK-NH <sub>2</sub>
Rp-II	ASCKCDDDGPDVRSATFTGTVDFWNCNEGWEKCTAVYTPVASCCRKKK-NH <sub>2</sub>
RTX-I	ASCKCDD <mark>DGPDVRSATFTGTVDFAYCNAGWEKCLAVYTPVA</mark> SCCRKKK
RTX-II	GTCKCDDDGPDVRTATFTGSTEFANCNESWEKCLAVYTPVASCCRKKK
RTX-III	GNCKCDDEGPYVRTAPLTGYVDLGYCNEGWEKCASYYSPIAECCRKKK-NH <sub>2</sub>
RTX-IV	GNCKCDDEGPNVRTAPLTGYVDLGYCNEGWDKCASYYSPIAECCRKKK
RTX-V	GNCKCDDEGPNVRTAPLTGYVDLGYCNEGWEKCASYYSPIAECCRKK-
RTX-VI	GNCKCDDEGPYV-TAPLTGYVDLGYCNEGWEKCASYYSPIAECCRKKK-NH <sub>2</sub>

Рисунок 34 – Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей нейротоксинов структурного типа 2 из актиний: SHTX-IV (B1B5I9) из *S. haddoni*, Rp-II (P01534) из *H. crispa/H. magnifica*, RTX-I (P30831), RTX-II (P30783), RTX-III (P30832), RTX-IV (P30784), RTX-V (P30785) и RTX-VI из *H. crispa* и Sh1 (P19651) из *S. helianthus* 

Два других выделенных нами нейротоксина также содержали амидированный остаток на С-конце молекулы [125]. Нейротоксин RTX-III идентифицировали на основании его моноизотопной молекулярной массы (5375,35 Да) и частичной N-концевой аминокислотной последовательности (1GNCKCDDEGPYV12), уникальной среди нейротоксинов актиний (Рисунок 34).

В результате алкилирования молекулы RTX-VI было получено два пептида с молекулярными массами 1509,61 и 4368,55 Да (Рисунок 35 А), в то время как алкилированный пептид должен был иметь молекулярную массу 5877,09 Да, соответствующую модификации шести остатков цистеина, как это ранее наблюдалось для нейротоксинов Rp-II и RTX-III.
Поэтому методом Эдмана был секвенирован нативный пептид, и обнаружены две N-концевые аминокислотные последовательности: Gly/Thr-Asn/Ala-Cys/Pro.



А – ОФ-ВЭЖХ проводили на колонке Luna С<sub>18</sub> (10×250 мм), уравновешенной 10%-ным ацетонитрилом в 0,1%-ной ТФУ, в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1%-ной ТФУ. Скорость элюции – 3 мл/мин.
 Отмечены границы объединения фракций. Во вставках показаны ИЭР масс-спектры, приведены средние молекулярные массы пептидов. Б – Присутствие одной или двух этилпиридиловых групп в составе пептида отмечено \* или \*\* соответственно. Сверху показаны идентифицированные фрагменты аминокислотной последовательности

Рисунок 35 – Профиль элюции продуктов алкилирования нейротоксина RTX-VI (A) и ИЭР МС/МС спектр однозарядного молекулярного иона алкилированного пептида 1 (1GNCKCDDEGPYV12) (Б)

Аминокислотную последовательность пептида 1 определили методом массспектрометрического секвенирования. На Рисунке 35 Б приведен MC/MC спектр однозарядного иона [M+H]<sup>+</sup> пептида 1. Все ионы b-серии были идентифицированы, за исключением  $b_1^+$  (Gly1-Asn2) и  $b_{10}^+$  (Pro10-Tyr11). Отсутствие пика иона  $b_{10}^+$  в спектре объясняется особенностями структуры Pro, приводящими к возникновению неустойчивого интермедиата. В то же время нам удалось идентифицировать пик иона  $y_2^+$  с массой 281,1496 Да, что свидетельствует о разрыве связи Pro10-Tyr11 (Рисунок 35 Б). На основании полученных данных было установлено, что последовательность пептида 1 имеет следующий вид: GNCKCDDEGPYV.

Поскольку MC/MC спектр алкилированного пептида 2 оказался неинформативным, его аминокислотная последовательность была определена автоматическим секвенированием по методу Эдмана. Показано, что пептид 2 состоит из 35 а.о. и имеет амидированный остаток Lys на C-конце: TAPLTGYVDLGYCNEGWEKCASYYSPIAECCRKKK.

Анализ пептидов 1 и 2 показал, что их аминокислотные последовательности полностью идентичны соответствующим фрагментам молекулы RTX-III [140], за исключением остатка Arg13, отсутствующего в молекуле RTX-VI (Рисунок 36). Таким образом, RTX-VI является первой обнаруженной в яде актинии молекулой, состоящей из двух полипептидных цепей, соединенных между собой двумя дисульфидными мостиками (C3-C43 и C5-C33) [125]. Необычная двухцепочечная структура нейротоксина RTX-VI имеет определенную аналогию со структурами нескольких двухцепочечных токсинов паука *Cupiennius salei*, CSTX-8, CSTX-12, CSTX-13 (34 и 29 а.о.), CSTX-14, CSTX-15 (34 и 14 а.о.), CSTX-16 (19 и 19 а.о.) [161]. Однако в структуре RTX-VI отсутствуют сайты для связывания фермента, осуществляющего посттрансляционную модификацию токсинов паука. Кроме того, у нас нет оснований предполагать, что RTX-VI способен действовать синергетически с другими компонентами ядовитого секрета актинии *H. crispa*, что характерно для двухцепочечного токсина CSTX-13 [161].

### 3.4 Вторичная структура пептидов H. crispa

Для анализа вторичной структуры пептидов *H. crispa* мы использовали спектроскопию кругового дихроизма (КД). Форма спектров КД молекул Hcr 1b-2 – Hcr 1b-4 (Рисунок 36 A) характерна для β-структурированных пептидов [125,126]. Сравнение со спектрами других APETx-подобных токсинов, APETx1 и BDS-I [155], показало, что спектры Hcr 1b-2 – Hcr 1b-4 и APETx1 практически идентичны по форме и амплитуде полос, в то время как спектр BDS-I заметно отличается. Поскольку все APETx-подобные токсины имеют единый фолд – антипараллельный β-лист, стабилизированный тремя дисульфидными связями [4,119], отличия в спектрах КД могут быть вызваны различием в конформации β-тяжей.



Рисунок 36 – Спектры КД пептидов Hcr 1b-2 – Hcr 1b-4 (А) и нейротоксинов Rp-II, RTX-III и RTX-VI (Б)

Вывод о наличии  $\alpha$ -спиралей в структуре пептида обычно делается на основании положительных максимумов в спектре КД в дальней УФ-области вблизи 190 нм и отрицательных – вблизи 207 и 222 нм [155]. В спектрах КД пептидов Hcr 1b-2 – Hcr 1b-4 отсутствует максимум вблизи 222 нм; кроме того, амплитуда в области отрицательного максимума (205 нм) сравнима с амплитудой положительного максимума (190 нм), что говорит об отсутствии существенного вклада  $\alpha$ -спиралей. Тем не менее, расчет содержания элементов вторичной структуры исследуемых пептидов и определение класса третичной структуры с помощью пакета программ CDPro [125,126] свидетельствует о наличии небольшого количества  $\alpha$ -спиралей (4–8%) в структуре пептидов Hcr 1b-2 – Hcr 1b-4. Согласно данным ЯМР, пептиды APETx1 и BDS-I (PDB ID: 1WQK и 1BDS) не содержат  $\alpha$ -спирали, небольшая  $\alpha$ -спираль обнаружена лишь в 3D структуре пептида APETx2 (21–25 а.о.) (PDB ID: 1WXN) [4,119].

Таблица 3 – Содержание элементов вторичной структуры белка, определенное на основании спектров КД. Индексы R, D и tot обозначают регулярную, нерегулярную структуру и их сумму

Пептид	α-спираль, %			β-тяж, %			в нариб <i>0</i> 4	Неупорядо-	
	$\alpha_{R}$	$\alpha_{\rm D}$	$\alpha_{tot}$	$\beta_R$	$\beta_{\rm D}$	$\beta_{tot}$	р-изгио, 70	ченная, %	
Hcr 1b-2	2,3	1,8	4,1	25,5	15,9	41,4	21,5	33,0	
Hcr 1b-3	1,1	2,2	3,3	26,2	16,1	42,3	23,9	30,5	
Hcr 1b-4	0,2	7,7	7,9	23,0	19,7	42,7	22,4	27,0	
Rp-II	0,4	4,7	5,1	22,6	12,1	34,7	23,5	36,7	
RTX-III	0,1	0,4	0,5	27,8	13,3	41,1	18,3	40,1	
RTX-VI	0,0	0,3	0,3	26,9	13,6	40,5	20,9	38,3	

На Рисунке 36 Б представлены спектры КД токсинов Rp-II, RTX-III и RTX-VI, которые практически не различаются по форме и амплитуде полос. Все спектры имеют полосы вблизи 200 нм (отрицательный вклад), 230 и 190 нм (положительный вклад), характерные для

нейротоксинов [61,65,162]. Общий вид полученных нами спектров КД нейротоксинов *H. crispa* свидетельствует о преимущественном содержании в них β-тяжей.

Расчет содержания элементов вторичной структуры показал, что значительная часть (35– 40%) полипептидной цепи всех трех нейротоксинов имеет β-конформацию. На долю неупорядоченной структуры приходится от 36 до 40%. Эти участки полипептидной цепи соответствуют петлям, соединяющим β-тяжи. Самой протяженной и гибкой петлей, вероятно, является так называемая Arg-петля, которая может составлять до 25% аминокислотной последовательности пептида. Оставшаяся часть молекулы (18–23%) представлена β-изгибами, которые также являются характерными элементами пространственной структуры нейротоксинов актиний.

Полученные данные соответствуют опубликованным ранее результатам ЯМР спектроскопии нейротоксинов RTX-III [163] и Rp-II [153]. В совокупности они свидетествуют о том, что RTX-III и Rp-II представляют собой  $\beta$ -структурированные пептиды, не содержащие  $\alpha$ -спиралей. Ядро молекул нейротоксинов – это компактный сильно скрученный четырехтяжевый  $\beta$ -лист. Первый и второй антипараллельные  $\beta$ -тяжи соединены протяженным участком, имеющим неупорядоченную структуру (Arg-петля, а.о. 7–16) и содержащим функционально важные для нейротоксинов а.о. 6, 8 и 13 [63–65]. Полученные методами ЯМР пространственные структуры нейротоксинов 1 и 2: АрА (PDB ID: 1Ahl), ApB (1Apf), ATX-I (1Atx), CgNa (2H9x) и Sh1 (1Shi, 1Sh1 и 2Sh1), подтверждают данные о структуре молекул RTX-III и Rp-II [1,4,164].

Очевидно, отсутствие одного из аминокислотных остатков, нарушающее целостность полипептидной цепи, не ведет к существенным изменениям вторичной структуры, и токсин RTX-VI сохраняет характерный для нейротоксинов актиний типов 1 и 2 фолд – четырехтяжевый β-лист, соединенный тремя петлями и стабилизированный тремя дисульфидными мостиками.

# 3.5 In silico анализ пространственных структур пептидов H. crispa

Теоретические модели пространственных структур нейротоксинов Rp-II и RTX-III, а также APETх-подобных пептидов Hcr 1b-2, Hcr 1b-3 и Hcr 1b-4 генерировали, используя метод гомологичного моделирования. Прототипом для создания гомологичных моделей 3D стуктур нейротоксинов Rp-II и RTX-III послужила 3D структура токсина Sh1 (PDB ID: 2Sh1), полученная методом ЯМР спектроскопии [165]. Среди нейротоксинов актиний, пространственная структура которых была установлена (ApA, ApB, ATX-I, CgNa и Sh1 [1,4]), Sh1 является ближайшим гомологом (идентичность 67%) нейротоксинов Rp-II и RTX-III и RTX-III и единственным представителем структурного типа 2 (как и токсины *H. crispa*). Анализ карты

Рамачандрана показал, что полученные 3D структуры Rp-II и RTX-III не имеют конформационных затруднений: более 90% аминокислотных остатков находится в благоприятной конформации, а оставшиеся – в допустимой. Содержание элементов вторичной структуры в моделях согласуется с данными спектроскопии КД выделенных пептидов. Это свидетельствует о достаточно высоком качестве полученных моделей [125].

Несмотря на то, что топология дисульфидных связей в молекулах Rp-II и RTX-III не была определена экспериментально, результаты моделирования однозначно демонстрируют, что она не может отличаться от той, что характерна для Sh1 и других нейротоксинов, и обеспечить при этом сохранение вторичной структуры и фолда молекулы [125]. Это однозначно подтверждается тем, что все теоретические модели 3D структур Rp-II и RTX-III с альтернативной топологией дисульфидных связей представляют собой молекулы, преимущественно состоящие из спиралей и неупорядоченных участков, что противоречит результатам спектроскопии КД выделенных пептидов.

В качестве прототипов для создания моделей пространственной структуры пептида Hcr 1b-2 использовали 3D структуры гомологичных токсинов, ингибирующих ASIC3 и  $K_V$  каналы: APETx2 (идентичность 54%) [118,119], APETx1 (49%) [166] и BDS-I (39%) [167], полученные из базы данных Protein Data Bank (PDB) [126]. Модели, основанные на 3D структуре APETx2 (PDB ID 1WXN), имели минимальные значения RMSD (среднеквадратичное отклонение координат атомов основной цепи), а подавляющее большинство аминокислотных остатков было расположено в энергетически благоприятных областях карты Рамачандрана. Поэтому 3D структура APETx2 послужила прототипом для гомологичной модели молекулы Hcr 1b-4. Модель Hcr 1b-3 получили путем мутации Asn22Asp ранее созданной гомологичной модели молекулы Hcr 1b-2. Анализ полученных гомологичных моделей 3D структур APETx-подобных пептидов показал, что в них отсутствуют конформационные затруднения, а содержание элементов вторичной структуры соответствует расчетам по данным спектроскопии KД [126].

Установлено, что фолды APETx-подобных пептидов и нейротоксинов структурных типов 1 и 2 достаточно близки. Их молекулы имеют общую схему дисульфидных связей (C1-C5, C2-C4, C3-C6), а идентичность их аминокислотных последовательностей составляет около 30%. Все они принадлежат к еще более широкой группе β-дефензинов, небольших (35–50 а.о.) положительно заряженных пептидов, способных ингибировать ионные каналы [4].

Взаимное расположение β-тяжей и дисульфидных мостиков в структурах АРЕТхподобных пептидов и нейротоксинов аналогично (Рисунок 37), однако для нейротоксинов характерен заметно более скрученный β-лист [165], чем для АРЕТх-подобных пептидов, в структуре которых, в свою очередь, может отсутствовать N-концевой β-тяж (BDS-I) [167] или присутствовать короткая α-спираль (APETx2) [118]. Отличия также проявляются в длине и

77

конформации участков, соединяющих β-тяжи. Так, протяженную и гибкую Arg-петлю нейротоксинов в структуре APETx-подобных пептидов заменяет короткий β-изгиб (Рисунок 37). Учитывая сходство третичной структуры APETx-подобных пептидов и нейротоксинов, не удивительно, что петиды APETx1 – APETx4 способны модулировать токи Na<sub>V</sub> каналы [121,156]. С другой стороны, особенности пространственной структуры APETx-подобных пептидов обеспечивают им возможность ингибировать К<sub>V</sub> и ASICs каналы [118].



Дисульфидные связи (стержневые фрагменты) окрашены черным. Визуализация выполнена с помощью программы Chimera

Рисунок 37 – Ленточные диаграммы 3D структур нейротоксина структурного типа 2 Sh1 из *S. helianthus* (PDB ID: 2Sh1 [165]) и токсина APETx2 из *A. elegantissima* (PDB ID: 1WXN [119])

С точки зрения функциональной значимости конкретных аминокислотных остатков для активации Nav каналов, наиболее изучены нейротоксины ApB из *A. xanthogrammica* [51,61,63,64] и ATX-II из *A. sulcata* [65]. В связи с тем, что сканирующий мутагенез выявил отличия между аминокислотными остатками, обеспечивающими сохранение активности ApB и ATX-II [65], следует быть осторожным, при рассуждении о влиянии аминокислотных замен на активность различных нейротоксинов актиний, несмотря на их гомологию [61–65]. Частично это объясняется направлением дипольного момента молекулы нейротоксина, влияющим на ее ориентацию в комплексе с каналом. Различное направление дипольного момента гомологичных нейротоксинов ApB и ATX-II может объяснить определенные различия в свойствах и локализации функционально значимых остатков [49,65].

Идентичность между нейротоксинами *H. crispa* и токсинами ApB и ATX-II составляет 33–39%, что подразумевает значительное число аминокислотных замен, включая несколько остатков, определяемых как ключевые для сохранения активности нейротоксинов. Кроме того, направления дипольных моментов молекул нейротоксинов различаются, особенно в случае

АТХ-II (Рисунок 38). Мы полагаем, что следующие особенности структуры RTX-III и Rp-II, отличающие их от нейротоксинов структурного типа 1 (ApB и ATX-II), могут оказать негативное влияние на активность токсинов *H. crispa* в отношении Na<sub>V</sub> каналов: замена Asn/Ala в положении 15 (Тип1/Тип2) [61,65], отсутствие остатка Gly в положении 14 (Тип 2), снижающее гибкость Arg-петли [62], а также замена кластера положительно заряженных остатков, Lys37-Ala38-His39 (ApB) или Lys35-Lys36-His37 (ATX-II), на гидрофобные a.o. Ala34-Ser35-Tyr36 (RTX-III) и Thr34-Ala35-Val36 (Rp-II) (Рисунок 38) [49,61,65].



Б-Д – Аминокислотные остатки (шаровые модели) окрашены согласно свойствам боковой цепи – голубым (основные), розовым (ароматические), зеленым (алифатические), оранжевым (полярные). Стрелками обозначены дипольные моменты. Визуализация выполнена с помощью программы Discovery Studio Visualyzerr

Рисунок 38 – Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей нейротоксинов (A), ленточные диаграммы 3D структур ApB (PDB ID 1Apf [168]) из A. *xanthogrammica* (Б) и гомологичных моделей 3D структур токсинов ATX-II (прототип ApA, PDB ID: 1Ahl [169]) из A. *sulcata* (B), RTX-III (Г) и Rp-II (Д) из H. crispa

Результаты компьютерного моделирования структуры комплекса Rp-II с каналом  $Na_V 1.2$  свидетельствуют о том, что основной вклад в образование комплекса вносят a.o. токсина Asp6, Asp7, Asp11, Arg13, Val21, Trp24, Asn25, Glu31, Lys32, Cys33, Val36, Thr38 и Arg45-Lys46-

Lys47-Lys48 [125]. Полученные данные значительно отличаются от результатов исследования ApB и ATX-II, что подтверждает предположение о существенных различиях между фармакофорами нейротоксинов структурных типов 1 и 2.

Подобно другим ингибиторам ASIC каналов, APETx-подобные пептиды *H. crispa* являются сильно основными молекулами (теоретическая изоэлектрическая точка Hcr 1b-2, Hcr 1b-3, Hcr 1b-4 и APETx2: 9,53, 9,23, 9,26 и 9,33) [124]. Как уже отмечалось выше, связывание молекулы токсина APETx2 с ASIC3 каналом обеспечивает кластер, включающий основные и гидрофобные остатки: Thr2, Phe15-Tyr16-Arg17, Phe33 и Ley34 [118]. При этом функциональная роль гидрофобных остатков APETx2 во многом определяется тем, что они локализованы вблизи основного а.о. Arg17 [118] (Рисунок 39). На поверхности молекул Hcr 1b-2 – Hcr 1b-4 обнаружены аналогичные кластеры: Thr2, Phe15-Met16-Leu17, Phe33-Leu34 (Hcr 1b-2 и Hcr 1b-3), а также Thr2, Phe15-Met16-Leu17, Phe33-Met34 (Hcr 1b-4), включающие, однако, только гидрофобные остатки [126]. Таким образом, их вклад во взаимодействие с каналом может значительно варьировать в зависимости от ориентации молекулы пептида при образовании комплекса.

Гомологичные модели демонстрируют, что в молекулах Hcr 1b-2 и Hcr 1b-3 основные аминокислотные остатки (Lys5, His7 и Lys40-Lys41) расположены на противоположной (по сравнению с APETx2) стороне молекулы и окружены кластером гидрофобных остатков, состоящим из Cys6, Ile10, Val12, Leu28 и Cys30 (Рисунок 39). На поверхности молекулы Hcr 1b-4 локализовано два кластера, включающих основные и гидрофобные остатки: Lys40-Arg41, аналогичные С-концевым положительно заряженным остаткам других пептидов *H. crispa*, а также расположенные на противоположной стороне молекулы остатки Arg19 и His31, находящиеся в окружении гидрофобных остатков Phe15-Met16-Leu17, Cys20, Ile36 и Phe33-Met34 [126].

При этом часть гидрофобных остатков, формирующих кластеры, может не вносить непосредственного вклада во взаимодействие с каналом, как это было показано ранее для APETx2. Остаток Arg31 рассматривался как один из функционально важных, так как входил в кластер, включающий Phe15-Tyr16-Arg17, Phe33 и Leu34. Однако аланиновый мутагенез показал, что замена Arg31 не влияет на ингибирующую активность APETx2 в отношении ASIC3 [118]. В связи с этим предположения о роли конкретных остатков APETx-подобных пептидов в образовании комплекса с ASIC каналами должны формироваться на основании коплексного подхода, сочетающего методы молекулярного моделирования с применением экспериментальных (сканирующий мутагенез подходов В сочетании с электрофизиологическими экспериментами).



Синим цветом окрашены основные остатки, красным – кислые, желтым – гидрофобные. Визуализация выполнена с помощью программы Discovery Studio Visualyzer

Рисунок 39 – Показаны молекулярные поверхности пептидов APETx2 (PDB ID: 1WXN) (A), Hcr 1b-2 (Б), Hcr 1b-3 (В) и Hcr 1b-4 (Г)

Из вышесказанного можно сделать вывод о том, что, несмотря на высокую степень идентичности APETx-подобных пептидов *H. crispa* между собой (78–95%) и с молекулой-прототипом APETx2 (46–49%), точечные аминокислотные замены, затрагивающие немногочисленные заряженные остатки, приводят к тому, что молекулы Hcr 1b-2, Hcr 1b-3 и Hcr 1b-4 отличаются друг от друга и от APETx2 распределением электростатического потенциала и, как следствие, направлением дипольного момента [126]. На рисунке 40 видно, что дипольные моменты пептидов *H. crispa* и APETx2 имеют различное направление. Примечательно, что аналогичная ситуация наблюдается и при сравнении Hcr 1b-2 и Hcr 1b-3 с пептидом Hcr 1b-4.

Дипольный момент – это ключевая характеристика электростатических полей, окружающих молекулы токсинов и каналов. Электростатическое поле играет решающую роль в процессе взаимного «распознавания» лиганда и рецептора. Оно определяет взаимную ориентацию молекул в комплексах токсин-канал и их стабильность, а также во многом обусловливает биологическую активность молекул токсинов. Обнаруженные нами различия в распределении электростатического потенциала в молекулах АРЕТх-подобных пептидов свидетельствуют в пользу того, что фармакофоры APETx2, Hcr 1b-2, Hcr 1b-3 и Hcr 1b-4 Это включают различные аминокислотные остатки. подтверждают И результаты компьютерного моделирования структуры комплексов пептидов Hcr 1b-2 и Hcr 1b-4 с ASIC1a каналом [126]. Согласно полученным данным, ключевую роль во взаимодействии с каналом

играют a.o. Lys5, His7, Tyr9 и Lys40-Lys41 пептида Hcr 1b-2, а также Tyr7, Tyr9, Arg19, Ser22-Gly23-Tyr24, Asn27-Ley28, Lys40-Arg41 пептида Hcr 1b-4 [126].



Показан молекулярный электростатический потенциал и дипольный момент молекул (обозначен стрелкой). Эквипотенциальные поверхности окрашены в красный (отрицательный потенциал) и синий (положительный) цвета. Расчеты МЭП и визуализация выполнены с помощью программ Swiss PDB Viewer и Chimera

Рисунок 40 – Ленточные диаграммы 3D структуры APETx2 (PDB ID: 1WXN) (A) и гомологичных моделей 3D структур Hcr 1b-2 (Б), Hcr 1b-3 (В) и Hcr 1b-4 (Г)

# 3.6 Электрофизиологическое исследование пептидов H. crispa

# 3.6.1 Электрофизиологическое исследование АРЕТх-подобных пептидов

Поскольку ранее было показано, что токсин APETx2 и пептид Hcr 1b-1, ближайшие гомологи пептидов Hcr 1b-2 – Hcr 1b-4, ингибируют протон-чувствительные ASIC3 каналы [99,101], было изучено влияние новых APETx-подобных пептидов *H. crispa* на токи гомомерных rASIC1a и rASIC3 каналов, экспрессированных в ооцитах лягушки *X. laevis* [124,126]. Каналы активировали быстрым снижением pH буферного раствора с 7,4 до 5,5 (ASIC1a) или 4,0 (ASIC3) спустя 15 секунд после аппликации пептидов. Модулирующий эффект Hcr 1b-2 – Hcr 1b-4 был полностью обратим, амплитуда токов восстанавливалась на 100% после отмывки пептида. Полученные значения коэффициента Хилла (n<sub>H</sub>), характеризующего количество сайтов связывания пептидов с каналами, были близки к единице (Таблица 4), следовательно, ингибирующее/потенцирующее действие пептидов обусловлено их взаимодействием с единственным сайтом.

Установлено, что Hcr 1b-2 – Hcr 1b-4 являются первыми представителями APETxподобных пептидов, продуцируемых актиниями, которые оказывают ингибирующее действие на токи ASIC1a каналов. В насыщающих концентрациях (100 – 120 мкМ) они ингибируют амплитуду тока через ASIC1a каналы на 64, 70 и 86% (Рисунок 41 А, В, Д, Таблица 4). Кроме того, показано, что пептиды Hcr 1b-2 и Hcr 1b-3 в максимальной исследованной концентрации (120 мкМ) ингибируют токи ASIC3 каналов на ~81 и ~74% соответственно (Рисунок 41 Б, Г, Таблица 4).

Понтил	IC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub> , мкМ	$I_{\text{инг.}}/I_{\text{контр.}}$ , %	n <sub>H</sub>	Ссылка
пентид		ASIC1a		
Hcr 1b-2	$\downarrow$ IC <sub>50</sub> 4,8±0,3	36,4±11	0,92±0,05	[124]
Hcr 1b-3	$\downarrow$ IC <sub>50</sub> 4,95±0,19	30,3±0,7	1,20±0,05	[126]
Hcr 1b-4	$\downarrow$ IC <sub>50</sub> 1,25±0,04	13,7±0,8	1,08±0,03	[126]
		ASIC3		
Hcr 1b-2	$\downarrow$ IC <sub>50</sub> 15,9±1,1	19,2±1,7	1,0±0,05	[124]
Hcr 1b-3	$\downarrow$ IC <sub>50</sub> 17,0±5,8	26±7	0,9±0,2	[126]
Hcr 1b-4	$\uparrow EC_{50} 1,53\pm0,07$	207,78±1,56	1,30±0,06	[126]
Принканалика				

Таблица 4 – Модулирующая активность пептидов Hcr 1b-2 – Hcr 1b-4 в отношении ASIC1a и ASIC3 каналов

Примечание

Стрелками ↓ и ↑ обозначены ингибирующий и потенцирующий эффекты пептидов соответственно

Нельзя также исключать вероятность того, что оба пептида способны полностью ингибировать пиковый ток, а наблюдаемый в электрофизиологических экспериментах компонент является так называемым стационарным током. Феномен стационарного тока является особенностью электрофизиологических характеристик ASIC3 каналов, которая позволяет им генерировать и передавать электрические сигналы в условиях продолжительного и глубокого ацидоза [69]. К настоящему моменту известен лишь один пептидный токсин, ингибирующий оба компонента тока, Ugr 9a-1 из актинии *U. grebelnyi* [98]. Для того, чтобы установить, способны ли пептиды Hcr 1b-2 и Hcr 1b-3 ингибировать стационарный ток, требуются дополнительные электрофизиологические исследования.

Интересно, что пептид Hcr 1b-4, напротив, увеличивает амплитуду тока через ASIC3 каналы до 208% (Рисунок 41 Е). Это первый пептид, для которого была показана способность потенцировать каналы подтипа ASIC3. Его аппликация при физиологических значениях pH не активирует ASIC3, однако при снижении pH буферного раствора до 4,0 в два раза увеличивает амплитуду протон-индуцированных токов.

Ранее токсины актиний считались ингибиторами гомомерных ASIC3 и гетеромерных ASIC3-содержащих каналов. Тем не менее, токсин APETx2 из *A. elegantissima*, способный ингибировать ASIC3, потенцирует другие подтипы ASICs – гомомерные ASIC1b и ASIC2a каналы [120], в то время как ингибиторы ASIC1a из пауков (токсины PcTx1, Hi1a, Hm3a)

являются потенциаторами гомомерных ASIC1b и/или гетеромерных ASIC1a/1b каналов [90]. Обычно для активации каналов требуется бо́льшая концентрация токсинов, чем для ингибирования. Однако установлено, что пептид Hcr 1b-4 ингибирует ASIC1a и активирует ASIC3 каналы в одном диапазоне концентраций (Таблица 4).



Записи токов через мембрану клетки ооцита *X. laevis*, вызванных изменением значения pH буферного раствора с 7,4 до 5,5 (ASIC1a) или 4,0 (ASIC3). Приведены три последовательные записи на одном ооците. Время аппликации и значение pH буферных растворов показаны над кривыми Рисунок 41 – Влияние пептидов Hcr 1b-2 – Hcr 1b-4 в концентрации 10 мкМ на токи

гомомерных ASIC1a (A, B, Д) и ASIC3 (Б, Г, Е) каналов

Сравнение значений концентрации полумаксимального ингибирования (IC<sub>50</sub>) для Hcr 1b-2 и Hcr 1b-3 в отношении ASIC3 и ASIC1а показало, что оба пептида являются в три раза более мощными ингибиторами ASIC1а каналов (Рисунок 42, Таблица 4). Этот результат оказался неожиданным, так как ранее среди пептидов актиний ингибиторы ASIC1a каналов не были обнаружены. Считалось, что ASIC1a ингибируются исключительно токсинами пауков и змей. Активность пептидов Hcr 1b-2 и Hcr 1b-3 оказалась практически идентичной, что не удивительно, поскольку они различаются единственной аминокислотной заменой – Asn22Asp. Согласно полученным данным, в концентрации ниже 10 мкМ пептид Hcr 1b-2 более эффективно ингибирует ASIC1a каналы, а в насыщающих концентрациях (свыше 100 мкМ) он более эффективно ингибирует ASIC3 (Рисунке 42 А, Таблица 4). Пептид Hcr 1b-3 ингибирует токи ASIC1a более эффективно в диапазоне концентраций от 1 до 100 мкМ, но максимальная эффективность ингибирования ASIC1a и ASIC3 каналов практически одинакова (65–70%).



Зависимости отношения величины токов через ASIC1 (А) и ASIC3 (Б) каналы (после аппликации пептида) к контрольному значению тока (І<sub>инг</sub>/І<sub>контр</sub>) от концентрации пептида. Каждая точка – среднее значение (± s.d.) пяти независимых измерений (n = 5)

Рисунок 42 – Ингибирующий эффект пептидов Hcr 1b-2 – Hcr 1b-4 на токи ASIC каналов

Пептид Нсг 1b-4 является в четыре раза более активным модулятором ASIC3 каналов, чем другие токсины *H. crispa*, и на порядок более активным ингибитором ASIC1a. Значения полумаксимальной эффективной концентрации (EC<sub>50</sub>) и IC<sub>50</sub> для него составляют  $1,53\pm0,07$  мкМ и  $1,25\pm0,04$  мкМ соответственно (Рисунок 42 A, 43, Таблица 4). В то же время Hcr 1b-4 значительно уступает в активности токсину APETx2 (IC<sub>50</sub> 0,063 мкМ) [99], ингибиторам ASIC1a из ядов пауков – Hi1a (0,4 нМ) [78] и PcTx1 (0,9 нМ) [91], или змей – Ma-1 (55 nM) [100]. Эффективность ингибирования ASIC1a каналов пептидом Hcr 1b-4 была заметно выше, чем у Hcr 1b-2 и Hcr 1b-3 во всем диапазоне исследованных концентраций (Рисунок 42 A).

Активность пептида Hcr 1b-4 в отношении ASIC3 каналов превосходит модулирующую активность нейропептида-потенциатора из моллюска *Conus textile*, RPRFa (EC<sub>50</sub> 3–4 мкM) [170], и почти не уступает активности MitTx $\alpha/\beta$  (EC<sub>50</sub> 9,4±1,3 нM) [103], единственного известного токсина змеи, который активирует ASIC3 каналы при физиологических значениях pH. Показано, что эти потенциаторы/активаторы ASIC3 каналов при введении экспериментальным

животным вызывают у них сильные болевые ощущения [103,170], в то время как ингибиторы ASIC1a оказывают анальгетическое действие [69]. Учитывая эти факты, а также то, что пептид Hcr 1b-4 действует на ASIC1a и ASIC3 каналы в одном диапазоне концентраций, сложно спрогнозировать, каков будет его эффект при исследовании *in vivo*.



Зависимость отношения величины тока через ASIC3 каналы (после аппликации пептида) к контрольному значению (І<sub>инг</sub>/І<sub>контр</sub>) от концентрации пептида. Каждая точка – среднее значение (± s.d.) пяти независимых измерений (n = 5)

Рисунок 43 – Потенцирующий эффект пептида Hcr 1b-4 на токи ASIC3 каналов

Таким образом, мы установили, что хотя все выделенные нами пептиды актинии H. *crispa* являются относительно слабыми ингибиторами ASIC каналов, их активность существенно отличается от активности известных токсинов-модуляторов [90]. Впервые было показано, что пептиды актиний способны ингибировать ASIC1a каналы. Мы также обнаружили первый пептид-потенциатор ASIC3 каналов. Ранее MitTx $\alpha/\beta$  был единственным токсином, действующим одновременно на два основных подтипа каналов, ASIC1a и ASIC3 [90]. Полученные нами данные демонстрируют, что пептиды актиний способны ингибировать как ASIC1a, так и ASIC3 (Hcr 1b-2 и Hcr 1b-3), а также оказывать противоположное действие на токи этих каналов (Hcr 1b-4) [124,126].

# 3.6.2 Электрофизиологическое исследование нейротоксинов

Подавляющее большинство электрофизиологических исследований нейротоксинов актиний проводилось с участием пептидов АрА и АрВ из A. xanthogrammica, APE1-5 из A. elegantissima, ATX-I – ATX-III и ATX-V из A. sulcata, AFT-II из A. fuscoviridis, Bc-III из B. caissarum, CgNa из C. gigantea, Bg-II и Bg-III из B. granulifera, CGTX, CGTX-II и CGTX-III из B. cangicum [1,35,49]. Наиболее полно, с точки зрения селективности в отношении различных изоформ Nav млекопитающих, были охарактеризованы токсины ATX-II, ATF-II, CgNa, Bc-III и CGTX-II (Таблица 5) [35]. Все перечисленные нейротоксины были выделены из актиний семейства Actiniidae и принадлежат структурному типу 1. В то же время нейротоксины актиний, принадлежащих к семейству Stichodactylidae, остаются практически неисследованными. При этом идентичность нейротоксинов типов 1 (Actiniidae) и 2 (Stichodactylidae) не превышает 50%, а многочисленные аминокислотные замены могут оказать

существенное влияние на характер взаимодействия токсинов с их основной молекулярной мишенью, потенциал-зависимыми натриевыми каналами (Na<sub>v</sub>).

Таблица 5 – Эффект токсинов Bc-III, ATF-II, ATX-II [171], CGTX-II [172] и CgNa [173], а также трех нейротоксинов *H. crispa*, Rp-II, RTX-III и RTX-VI (концентрация 10 мкМ), на Na<sub>v</sub> каналы млекопитающих (Na<sub>v</sub>1.1 – Na<sub>v</sub>1.6), таракана (BgNa<sub>v</sub>) и клеща (VdNa<sub>v</sub>), экспрессированных в ооцитах *X. laevis* 

Токсин	Na <sub>v</sub> 1.1	Na <sub>v</sub> 1.2	Na <sub>v</sub> 1.3	Na <sub>v</sub> 1.4	Na <sub>v</sub> 1.5	Na <sub>v</sub> 1.6	Na <sub>v</sub> 1.7	Na <sub>v</sub> 1.8	BgNa <sub>v</sub> 1	VdNa <sub>v</sub> 1
Bc-III	+	+	+	+	+	+	H.o.	Н.о.	H.o.	H.o.
AFT-II	+	+	+	+	+	+	H.o.	Н.о.	Н.о.	H.o.
ATX-II	+	+	+	+	+	+	Н.о.	Н.о.	Н.о.	H.o.
CGTX-II	-	-	-	-	+	+	-	Н.о.	Н.о.	H.o.
CgNa	-	-	+	-	+	+	-	H.o.	Н.о.	H.o.
Rp-II	+	+	-	-	-	+	H.o.	-	+	+
RTX-III	-	-	+	-	-	+	H.o.	-	+	+
RTX-VI	-	+	-	-	-	+	Н.о.	-	+	+

Примечание

Н.о. – активность нейротоксинов в отношении Nav каналов не определялась

Мы впервые исследовали модулирующую активность трех нейротоксинов актинии H. crispa (Stichodactylidae) в отношении девяти подтипов Na<sub>V</sub> каналов млекопитающих и членистоногих [125]. Нейротоксины Rp-II, RTX-III и RTX-VI (тип 2) апплицировали в концентрации 10 мкМ, чтобы установить, влияют ли они на токи, проходящие через каналы млекопитающих (Na<sub>V</sub>1.1 – Na<sub>V</sub>1.6 и Na<sub>V</sub>1.8), таракана *Blattella germanica* (BgNav1) и паразитического клеща *Varroa destructor* (VdNav1), экспрессированные в ооцитах *X. laevis* (Таблица 5). Электрофизиологическое исследование показало, что, подобно другим нейротоксинам актиний, Rp-II, RTX-III и RTX-VI являются активаторами Na<sub>V</sub>.

Нейротоксины актинии *H. crispa* активируют натриевые каналы членистоногих (BgNa<sub>v</sub>1 и VdNa<sub>v</sub>1), а также каналы ЦНС млекопитающих (Na<sub>v</sub>1.1 – Na<sub>v</sub>1.3, Na<sub>v</sub>1.6), но не каналы кардиомиоцитов (Na<sub>v</sub>1.5), ПНС (Na<sub>v</sub>1.8) или опорно-двигательной системы (Na<sub>v</sub>1.4) (Таблица 5, Рисунки 44–45). Ранее Schweitz и соавторы установили, что нейротоксин Rp-II, выделенный из *H. magnifica*, замедляет инактивацию тетродоксин-чувствительных Na<sub>v</sub> каналов, экспрессируемых клетками нейробластомы (NIE-115), и тетродоксин-устойчивых Na<sub>v</sub> миобластов скелетной мышечной ткани крыс [152]. Полученные нами результаты подтверждают, что Rp-II активирует Na<sub>v</sub>1.2, основной подтип тетродоксин-чувствительных каналов, который экспрессируют клетки нейробластомы. Однако нам не удалось обнаружить эффекта Rp-II на токи тетродоксин-устойчивых каналов Na<sub>v</sub>1.5 и Na<sub>v</sub>1.8. Каналы Na<sub>v</sub>1.9 также



Приведены суперпозиции трех последовательных записей токов, вызванных изменением мембранного потенциала, через мембрану клетки ооцита *X. laevis* в условиях контроля и в присутствии 10 мкМ токсина (отмечено \*)

Рисунок 44 – Влияние нейротоксинов Rp-II, RTX-III и RTX-VI на токи Nav каналов млекопитающих

88

генерируют тетродотоксин-устойчивый ток, но неизвестно, способен ли выделенный нами из *H. crispa* нейротоксин Rp-II активировать эти каналы.

![](_page_88_Figure_1.jpeg)

Приведены суперпозиции трех последовательных записей токов, вызванных изменением мембранного потенциала, через мембрану клетки ооцита *X. laevis* в условиях контроля и в присутствии 10 мкМ токсина (отмечено \*)

![](_page_88_Figure_3.jpeg)

Все токсины типа 1 и нейротоксины *H. crispa*, принадлежащие к типу 2, активируют  $Na_V 1.6$  каналы (Таблица 5), которые играют важную роль в инициировании потенциалов действия и наиболее распространены в ЦНС, но встречаются также в ПНС и кардиомиоцитах [15,174]. В то же время ни один из нейротоксинов *H. crispa*, в отличие от токсинов типа 1, не влияет на токи каналов кардиомиоцитов  $Na_V 1.5$ . В целом, нейротоксины Rp-II, RTX-III и RTX-VI значительно более селективны в отношении каналов млекопитающих  $Na_V 1.1 - Na_V 1.4$ , чем Bc-III, ATX-II и ATF-II. Профили активности CGTX-II, Rp-II и RTX-VI в отношении каналов  $Na_V 1.1$ ,  $Na_V 1.2$ ,  $Na_V 1.3$  и  $Na_V 1.4$  остаются уникальными; токсины RTX-III и CgNa оба активируют только  $Na_V 1.3$  (Таблица 5).

Удивительно, что отсутствие высоко консервативного остатка Arg13 и протеолиз полипептидной цепи меняет профиль активности нейротоксина RTX-VI. В отличие от RTX-III, он не способен модулировать Na<sub>v</sub>1.3, однако активирует Na<sub>v</sub>1.2. В то же время активность RTX-III и RTX-VI в отношении семи других подтипов Na<sub>v</sub> остается идентичной (Таблица 5, Рисунок 44). Исходя из полученных нами результатов, можно заключить, что Arg13 скорее участвует в распознавании различных подтипов Na<sub>v</sub> каналов нейротоксинами *H. crispa*, нежели играет определяющую роль во взаимодействии токсина с каналом. Это согласуется с данными о влиянии химической модификации Arg13 в молекуле RTX-III на ее токсичность. Так, B.M.

Махнырь и соавторы отмечают, что данный остаток не является ключевым для сохранения токсических свойств RTX-III [175]. Аналогичным образом Р. Khera и К. Blumenthal показали, что Arg14 (аналог Arg13) в молекуле ApB (тип 1) является существенно менее важным для сохранения активности, чем Arg12 [63]. Однако следует учитывать, что вклад Arg13 в образование комплекса с каналом может быть существенно выше для нейротоксинов типа 2. Остаток Arg13 находится на вершине протяженной Arg-петли, а его боковая цепь является гибкой и максимально доступной для формирования межмолекулярных нековалентных взаимодействий с каналом. Наличие, по крайней мере, одного положительно заряженного остатка в Arg-петле необходимо для связывания нейротоксина с Nav каналом и его последующей стабилизации в проводящем состоянии [63]. Если в молекуле ApB эта роль, очевидно, принадлежит Arg12, то Arg-петля нейротоксинов *H. crispa* (за исключением RTX-VI [125]) содержит единственный положительно заряженный остаток – Arg13.

Подобно многим другим нейротоксинам актиний, Rp-II, RTX-III и RTX-VI активируют каналы не только млекопитающих, но и членистоногих. При воздействии одинаковых концентраций нейротоксинов (10 мкМ) на каналы обоих таксономических групп амплитуда пикового тока через каналы членистоногих увеличивается в 2-3 раза и сохраняется длительное время (Рисунок 45), в то время как для каналов млекопитающих наблюдается довольно кратковременное и незначительное возрастание амплитуды (Рисунок 44). Под воздействием нейротоксинов *H. crispa* каналы BgNa<sub>V</sub>1 и VdNa<sub>V</sub>1 практически не инактивируются. Это позволяет рассматривать Rp-II, RTX-III и RTX-VI в качестве перспективеых инсектицидов.

Несмотря на высокую эффективность нейротоксинов Rp-II, RTX-III и RTX-VI в отношении каналов членистоногих, их активность в отношении BgNa<sub>V</sub>1 и VdNa<sub>V</sub>1 каналов оказалась в несколько раз ниже, чем в отношении каналов млекопитающих Na<sub>V</sub>1.2 и Na<sub>V</sub>1.6 (Таблица 6). Все исследованные нейротоксины *H. crispa* обладают максимальной активностью в отношении Na<sub>V</sub>1.2 (Na<sub>V</sub>1.2 > Na<sub>V</sub>1.6 > BgNa<sub>V</sub>1.1), а наиболее активным модулятором Na<sub>V</sub> является нейротоксин Rp-II (Rp-II > RTX-III > RTX-VI). Более того, по сравнению с RTX-III и RTX-VI, Rp-II более эффективно активирует Na<sub>V</sub>1.2 и BgNa<sub>V</sub>1.1 каналы во всем диапазоне концентраций (Рисунок 46 A, B).

Таблица 6 – Активность нейротоксинов Rp-II, RTX-III и RTX-VI в отношении Na<sub>v</sub>1.2, Na<sub>v</sub>1.6 и BgNa<sub>v</sub>1 каналов и значения коэффициента Хилла (n<sub>H</sub>)

Tomarry		EC <sub>50</sub> (нМ)		n <sub>H</sub>			
Токсин	Na <sub>v</sub> 1.2	Na <sub>v</sub> 1.6	BgNa <sub>v</sub> 1.1	$Na_V 1.2$	Na <sub>v</sub> 1.6	BgNa <sub>v</sub> 1.1	
Rp-II	79,5±4,3	183,5±8,2	226,1±12,3	0,9±0,1	1,0±0,1	0,6±0,1	
RTX-III	-	381,8±5,8	978,1±62,3	-	1,4±0,1	1,2±0,1	
RTX-VI	120,9±19,3	282,3±7,0	760,5±25,6	1,1±0,2	1,2±0,1	1,6±0,2	

Для канала Na<sub>v</sub>1.6 эффективность Rp-II была максимальной в диапазоне концентраций от 1 до 100 нМ. В насыщающей концентрации ( $10^4$  нм) нейротоксин RTX-III максимально эффективно (до 400%) активировал Na<sub>v</sub>1.6 и был практически в два раза более эффективен, чем Rp-II. Удивительно, что RTX-VI, который является продуктом посттрансляционной модификации токсина RTX-III, обладает почти в полтора раза более высокой активностью в отношении Na<sub>v</sub>1.6 и BgNa<sub>v</sub>1.1, чем RTX-III, и более эффективно увеличивает амплитуду токов Na<sub>v</sub>1.6 и BgNa<sub>v</sub>1.1 (Таблица 6, Рисунок 46 Б, В). В целом, нейротоксины *H. crispa* уступают в активности токсину ATX-II, но превосходят Bc-III и AFT-II [35].

![](_page_90_Figure_1.jpeg)

![](_page_90_Figure_2.jpeg)

Зависимость отношения величины тока через каналы (после аппликации нейротоксина) к контрольному значению (І<sub>30мс</sub>/І<sub>контр</sub>) от концентрации нейротоксина. Каждая точка – среднее значение (± s.d.) не менее пяти независимых измерений (n ≥ 5)

Рисунок 46 – Активирующийй эффект нейротоксинов Rp-II, RTX-III и RTX-VI на токи Na<sub>v</sub>1.2 (A), Na<sub>v</sub>1.6 (Б) и BgNa<sub>v</sub>1 (B) каналов

Поскольку полученные значения коэффициента Хилла были близки к единице (Таблица 6), можно предположить, что с Nav каналом связывается одна молекула токсина. Ранее было показано, что молекула RTX-III связывается с внеклеточным участком канала и активирует  $Na_V$ в результате аллостерической модификации воротного механизма канала [176]. Взаимодействие с токсином вызывает обширные конформационные канала, которые изменения распространяются далеко за пределы сайта связывания пептида (сайт 3) и затрагивают как внеклеточные, так и внутриклеточные участки Nav. Совместная аппликация RTX-III и TTX продемонстрировала, что после модификации Nav канала токсином актинии для его инактивации требуется в два раза больше молекул TTX [176].

Для дальнейшего изучения механизма активации Na<sub>V</sub> каналов нейротоксинами *H. crispa* были построены кривые потенциал-зависимой активации и инактивации каналов и определены значения  $V_{0,5 \text{ акт.}}$  и  $V_{0,5 \text{ инакт.}}$  (Таблица 7, Рисунок 47). Активации Na<sub>V</sub> каналов способствует смещение кривой активации в направлении отрицательных значений мембранного потенциала, при этом активация канала начинается при мембранном потенциале, близком к потенциалу покоя (канал становится более чувствительным к деполяризации,  $V_{0,5 \text{ акт.}}$  уменьшается). Таким образом действуют β-токсины скорпионов, связывающиеся с сайтом 4. Альтернативой является смещение кривой инактивации в направлении положительных значений мембранного потенциаля, образом действуют β-токсины скорпионов, связывающиеся с сайтом 4. Альтернативой является смещение кривой инактивации в направлении положительных значений мембранного потенциала. Это ведет к задержке инактивации, и Na<sub>V</sub> канал остается открытым на протяжении большего промежутка времени ( $V_{0,5 \text{ инакт.}}$  увеличивается). Этот механизм характерен для  $\alpha$ -токсинов скорпионов и нейротоксинов актиний.

Таблица 7 – Мембранный потенциал, при котором активация/инактивация  $Na_v 1.2$ ,  $Na_v 1.6$  и BgNa<sub>v</sub>1 каналов достигает 50% ( $V_{0,5}$ ) в условиях контроля в присутствии 100 нМ нейротоксинов Rp-II, RTX-III и RTX-VI

Tomorry		V <sub>0,5 акт.</sub>		V <sub>0,5 инакт.</sub>			
ТОКСИН	Na <sub>v</sub> 1.2	Na <sub>v</sub> 1.6	BgNa <sub>v</sub> 1.1	Na <sub>v</sub> 1.2	Na <sub>v</sub> 1.6	BgNa <sub>v</sub> 1.1	
контроль	-26,5±0,1	-26,6±0,1	-24,8±0,1	-57,7±0,2	-65,6±0,3	-60,2±1,0	
Rp-II	-27,4±0,1	-23,4±0,1	-24,5±0,1	$-50,1\pm0,2$	-64,0±0,2	-64,5±0,2	
контроль	-30,3±0,1	-26,6±0,2	-25,8±0,2	-58,7±0,3	-68,4±0,4	-53,7±0,1	
RTX-III	-32,2±0,1	-22,5±0,1	-14,1±0,1	-58,2±0,3	-59,0±0,6	-49,0±0,1	
контроль	-32,2±0,3	-23,9±0,1	-24,4±0,1	-58,2±0,3	-68,0±0,3	-65,3±0,5	
RTX-VI	-27,6±0,2	-22,5±0,1	-25,8±1,2	-54,8±0,2	-66,5±0,2	-60,7±0,2	

В основном нейротоксины Rp-II, RTX-III и RTX-VI смещают кривые активации в направлении положительных значений мембранного потенциала (Таблица 7, Рисунок 47). Это означает, что для начала активации каналов требуется более глубокая деполяризация мембраны. Максимально ингибируют активацию каналов нейротоксины RTX-III (BgNa<sub>V</sub>1) > RTX-VI (Na<sub>V</sub>1.2) > RTX-III (Na<sub>V</sub>1.6) > Rp-II (Na<sub>V</sub>1.6). Небольшое уменьшение величины  $V_{0,5 \text{ акт.}}$  Na<sub>V</sub>1.2 и BgNa<sub>V</sub>1 каналов в присутствии Rp-II, RTX-III и RTX-VI, напротив, способствует активации. Характерное для нейротоксинов актиний увеличение  $V_{0,5 \text{ инакт.}}$  наблюдается во всех случаях, кроме воздействия на канал BgNa<sub>V</sub>1 токсина Rp-II, который вызывает заметный сдвиг кривой в направлении отрицательных значений мембранного потенциала (Таблица 7, Рисунок 47). Максимально повышают значение потенциала, необходимое для начала инактивации, нейротоксины RTX-III (Na<sub>V</sub>1.6) > Rp-II (Na<sub>V</sub>1.2) > RTX-VI (BgNa<sub>V</sub>1) > RTX-VI (Na<sub>V</sub>1.2). Кроме того, в большинстве случаев (кроме RTX-III и Na<sub>V</sub>1.2) инактивация канала является неполной, особенно в случае RTX-III (Na<sub>V</sub>1.6) и RTX-VI (BgNa<sub>V</sub>1) (Рисунок 47).

![](_page_92_Figure_0.jpeg)

Каждая точка – среднее значение ( $\pm$  s.d.) не менее пяти независимых измерений ( $n \ge 5$ )

Рисунок 47 – Кривые активации (○) и инактивации (●) каналов Na<sub>V</sub>1.2, Na<sub>V</sub>1.6 и BgNa<sub>V</sub>1 в условиях контроля (черный) и в присутствии 100 нМ нейротоксинов Rp-II, RTX-III и RTX-VI (серый)

Таким образом, мы впервые исследовали селективность нейротоксинов структурного типа 2 относительно семи подтипов  $Na_V$  млекопитающих и двух каналов членистоногих и продемонстрировали более избирательное взаимодействие нейротоксинов *H. crispa* с  $Na_V 1.1 - Na_V 1.5$  каналами (по сравнению с токсинами типа 1, Bc-III, ATF-II и ATX-II). Было показано, что механизм активации  $Na_V$  токсинами Rp-II, RTX-III и RTX-VI заключается в ингибировании инактивации каналов и снижении их чувствительности к увеличению мембранного потенциала, что аналогично действию нейротоксинов актиний структурного типа 1. В связи с этим нейротоксины *H. crispa* представляют собой новые молекулярные инструменты для коррекции активности отдельных подтипов  $Na_V$  каналов.

93

# 3.7 Определение максимальной нетоксичной дозы пептидов *H. crispa* и анальгетической активности петида Hcr 1b-2

Определение максимальной нетоксичной дозы (МНТД) выделенных пептидов проводили на мышах линии CD-1. Пептиды, растворенные в 100 мкл физиологического раствора, вводили мышам внутрибрюшинно. Изменения в поведении и самочувствии экспериментальных животных наблюдали в течение часа после инъекции, а также спустя 24 часа. Ни один из пептидов Hcr 1b-2 – Hcr 1b-4 (в концентрации 0,312, 0,625, 1,25 и 10 мг/кг) не вызывал изменений в поведении животных или внешних признаков интоксикации, поэтому максимальной нетоксичной дозой была принята доза 10 мг/кг [124]. Отсутствие токсичности Hcr 1b-2 – Hcr 1b-4 согласуется с литературными данными о том, что ингибирующая активность пептидов в отношении ASIC каналов не приводит к возникновению токсических эффектов *in vivo* [116].

Анальгетический эффект Hcr 1b-2 пептида оценивали на модели кислотоиндуцированной мышечной боли. Эта модель наиболее тесно ассоциирована с функцией ASIC каналов в процессе восприятия боли. Она основана на способности раствора 1%-ной уксусной кислоты, введенного экспериментальным животным (мыши) внутрибрюшинно, вызывать у них корчи – чередование непроизвольного сокращения и расслабления брюшных мышц. Ранее данную модель использовали для тестирования анальгетического эффекта пептидов Hcr 1b-1 из H. crispa [101] и Urg 9-1 из U. grebelnvi [98], ингибирующих ASIC3 каналы. В ходе проведенного *in vivo* исследования было показано, что предварительное (за 60 минут до инъекции кислоты) введение пептида Hcr 1b-2 в дозе 0,625 мг/кг приводит к уменьшению количества корчей в три раза (15±3) по сравнению с количеством корчей контрольной группы мышей (47±4), инъецированных физиологическим раствором (Рисунок 48) [124]. Эти результаты совпадают с данными, полученными ранее для пептида Нсг 1b-1 в той же дозе [177]. При использовании анальгина (метамизол натрия), выбранного в качестве препарата сравнения, для достижения аналогичного эффекта антигипералгезии (23±2,5) потребовалась доза лекарственного препарата, в 80 раз превышающая дозу Hcr 1b-2 [124].

Учитывая выраженную антигипералгезию, вызванную введением Hcr 1b-2, этот пептид можно рассматривать в качестве лидерного пептида для разработки новых эффективных анальгетиков, действие которых направлено на коррекцию активности ASIC каналов. В связи с этим была определена его острая токсичность при внутривенном введении. Животным вводили Hcr 1b-2 в дозе 1 мг/кг однократно внутривенно в объёме 200 мкл. В течение 24 часов после инъекции за группой животных вели наблюдение, в ходе которого учитывали смертность и изменение физиологических показателей: моторики, поведенческих реакций, физической

активности, состояния волосяного покрова и внутренних органов. Поскольку у животных не было отмечено изменений в поведении и признаков интоксикации, а при вскрытии и оценке состояния их внутренних органов спустя 24 часа не было обнаружено видимых признаков гепато-, кардио-, нефротоксичности, интоксикации ЖКТ или проявления воспалительного процесса, был сделан вывод об отсутствии токсического эффекта пептида Hcr 1b-2 в дозе 1 мг/кг.

![](_page_94_Figure_1.jpeg)

Данные представлены как среднее значение (± s.d.) шести независимых измерений (n=6). \*p <0,01 Рисунок 48 – Действие пептида Hcr 1b-2 и анальгина (препарат сравнения) на модели кислотоиндуцированной мышечной боли

Токсичность пяти нейротоксинов структурного типа 2 из актинии *H. crispa*, RTX-I – RTX-V [138–141] ранее была определена в отношении млекопитающих и ракообразных. Значения ЛД<sub>50</sub> этих нейротоксинов для млекопитающих (мышь) варьировали от 0,0025 мг/кг (RTX-III) до 3,6 мг/кг (RTX-I) [138,140]. Интересно, что для ракообразных, прибрежных крабов *Hemigrapsus sp*, наблюдалась обратная закономерность, а значения ЛД<sub>100</sub> составили от 0,082 мг/кг (RTX-III) до 0,0035 мг/кг (RTX-I). Пептид Rp-II, выделеный из *H. magnifica*, в отличие от RTX-III, при внутрибрюшинном введении был на два порядка более токсичен для ракообразных (ЛД<sub>50</sub> 0,036 мг/кг), чем для млекопитающих (ЛД<sub>50</sub> 4,2 мг/кг) [152].

Для трех нейротоксинов, выделенных из водно-этанольного экстракта *H. crispa*, были определены МНТД [125]. В соответствии с ранее опубликованными данными, наиболее токсичный для млекопитающих RTX-III (в концентрации свыше 0,02 мкг/кг) вызывал судороги, паралич и гибель экспериментальных животных в течение 5–40 минут (в зависимости от дозы 8–0,04 мг/кг) после введения. Нейрооксин Rp-II в дозах, значительно превышающих МНТД (8–2,5 мг/кг), также приводил к судорогам, параличу конечностей и гибели животных. Выраженный нейротоксический эффект Rp-II отсутствовал (в дозе менее 0,5 мг/кг). Введение RTX-VI в концентрации 8–16 мг/кг, напротив, не вызывало симптомов нейротоксичности у мышей ни сразу после введения препарата, ни в течение 24 часов после иньекции. Отсутствие токсического эффекта RTX-VI, продукта предполагаемого протеолиза RTX-III, коррелирует с

ранее установленными фактами потери кардиостимулирующей активности и токсичности для ракообразных нейротоксинами ApA (тип 1) и Sh1 (тип 2) в результате ограниченного протеолиза, направленного на остаток Arg14/Arg13 [160].

Таким образом, пептиды *H. crispa* могут в дальнейшем найти применение в качестве соединений, корректирующих активность ASICs и  $Na_V$ , для устранения симптомов болевого синдрома, эпилепсии или аритмии, но только при условии тщательного изучения неоднозначных *in vivo* эффектов, связанных со сложностью физиологических процессов ассоциированных с функциями ASIC и  $Na_V$  каналов, и комплексного действия пептидов на эти каналы.

### Заключение

Благодаря достижениям современной протеомики и транскиптомики, в последние годы значительно возрасла эффективность идентификации новых биологически активных пептидов различных ядовитых организмов, молекулярными мишенями которых являются ионные каналы, участвующие во многих физиологических и патофизиологических процессах. Это, в свою очередь, привело к переоценке фармакологического потенциала и значимости токсинов в качестве инструментов для фундаментальных исследований ионных каналов. Теоретически, среди многообразия природных токсинов могут быть обнаружены достаточно мощные и селективные лиганлы, ориентированные на взаимолействие с различными типами фармакологически каналов. значимых ионных Альтернативным подходом является оптимизация структуры токсинов для повышения их селективности путем мутагенеза, способ, который также уже продемонстрировал свою эффективность. На данном этапе исследований как никогда очевидно, что для полноценного и всестороннего исследования особенностей функционирования, физиологической роли и фармакологического потенциа ионных каналов необходимо использвать достаточно большое число токсинов-лигандов, различющихся механизмом действия.

Протеомный анализ нейротоксической фракции актинии *H. crispa* показал, что она, единственная из исследованных представителей семейства Stichodactylidae, является перспективным источником полифункциональных АРЕТх-подобных пептидов, модулирующих фармакологически значимые ионные каналы: Nav, Kv и ASICs. В результате ионообменной хроматографии и/или ОФ-ВЭЖХ компопненов нейротоксической фракции было получено три новых АРЕТх-подобных пептида, Hcr 1b-2, Hcr 1b-3 и Hcr 1b-4, а также три нейротоксина структурного типа 2, Rp-II, RTX-III и RTX-VI, один из которых, RTX-VI, представляет собой уникальный двухцепочечный пептид. Аминокислотные последовательности новых пептидов были установлены с помощью секвенирования по методу Эдмана и тандемной массспектрометрии. Было показано, что, несмотря на высокую гомологию аминокислотных последовательностей (от 78 до 97%) АРЕТх-подобных пептидов *H. crispa*, направленность их действия (ингибирование/потенцирование) зависит от подтипа каналов, что объясняется различиями в распределении электростатического потенциала пептидов. Благодаря своей способности ингибировать одновременно ASIC1a и ASIC3 каналы, пептид Hcr 1b-2, вызывает антигипералгезию in vivo и обладает несомненным фармакологическим потенциалом. Кроме того, впервые было установлено, что нейротоксины, принадлежащие структурному типу 2, не являются видоспецифичными, действуя в наномолярных концентрациях на токи потенциалзависимых Nav каналов млекопитающих и членистоногих, но специфически взаимодействуют с

несколькими подтипами Na<sub>v</sub> млекопитающих, характерными для ЦНС. Нейротоксины *H. crispa* стабилизируют каналы в открытом состоянии, ингибируя их инактивацию. Полученные результаты могут иметь значение для оценки разнообразия токсинов актиний, а также понимания молекулярных механизмов и особенностей воздействия фармакологических агентов на функционирование Na<sub>v</sub> и ASIC каналов.

### Выводы

- 1. Проведен протеомный анализ нейротоксической фракции актинии *H. crispa*; установлено, что основными компонентами являются APETx-подобные пептиды.
- 2. Выделено три новых АРЕТх-подобных пептида, Hcr 1b-2, Hcr 1b-3 и Hcr 1b-4, а также три нейротоксина структурного типа 2, Rp-II, RTX-III и RTX-VI; установлены их аминокислотные последовательности; показано, что молекула нейротоксина RTX-VI является первым двухцепочечным пептидом, обнаруженным в актиниях.
- Показано, что APETx-подобные пептиды модулируют активность гомомерных ASIC1a и ASIC3 каналов, направленность действия пептидов (ингибирование или потенцирование) зависит от подтипа каналов.
- Установлено, что АРЕТх-подобные пептиды принципиально различаются распределением молекулярного электростатического потенциала, что определяет различия в их модулирующей активности.
- 5. Показано, что пептид Hcr 1b-2 вызывает антигипералгезию *in vivo* в модели кислотоиндуцированной мышечной боли.
- 6. Показано, что нейротоксины активируют Nav каналы млекопитающих (Nav1.1 Nav1, Nav1.6) и членистоногих (BgNav1, VdNav1), механизм их действия состоит в ингибировании инактивации каналов, в том числе из-за снижения их чувствительности к увеличению мембранного потенциала. Установлено, что высоко консервативный остаток Arg13 не является необходимой структурной детерминантой активности нейротоксинов типа 2, но влияет на их активность и селективность в отношении конкретных подтипов Nav.

### Приложение А

Ae1-1	-GIPCLCVSDGPSTRGNKLSGTIWMKTGGYGGNGCPKGWHFCGKSRGLLSDCCKQ-	
Ae4-1	-GVPCLCVSDGPRPRGNNLSGTIWMKTGGYGGNGCPKGWHFCGKSRGLLSDCCKQ-	
Ae2-1	-GVPCLCVSDGPRPRGNNLSGIMWMKTGGYGGNGCPKGWHFCGKSRGFFSDCCKR-	
Ae2-2	-GVPCLCVSDGPRPRGNNLSGIMWMKTGGYGGNGCPKGWHFCGKSRGFFSDCCKR-	
Ae2-3	-GVPCLCVSDGPRPRGNNLSGIMWMKTGGYGGNGCPKGWHFCGKSRGFFSDCCKR-	
Ae3-1	-GIPCLCVSDGPSTRGNNLSGIMWMKTGGYGGNGCPK <mark>GW</mark> HFCGKSRGFFSDCCKR-	
Am-3	-GFPCRCDSDGPSVHGNPLSGTIWVTSCATGWHKCNSENELFHECCKQ-	
Rc-1	-GVPCRCDSDGPSVHGNTLSGTIWVGSCETGWHKCNTEHNLFHECCKQ-	
CgNa	-GVPCRCDSDGPSVHGNTLSGTVWVGSCASGWHKCNDEYNIAYECCKE-	
Cp-2	-GVPCRCDSDGPSVHGNTLSGTVWVGSCASGWHKCNDEYNIAYECCKE-	
Cp-1	-GVPCRCDSDGPSVHGNTLSGTVWVGSCASGWHKCNTEHNIFHECCKE-	
Gigantoxin-2	-GVPCRCDSDGPHVRGNTLTGTVWVFGCPSGWHKCQKGSSTCCKQ-	
AETX-I	-GAPCLCANSGPNTRGNDLNGIVWVFGCPSGWHDCHGRA-MVGYCCQED	)
ATX-Ia	-GAACLCKSDGPNTRGNSMSGTIWVFGCPSGWNNCEGRA-IIGYCCKQ-	
ATX-Ib	-GAPCLCKSDGPNTRGNSMSGTIWVFGCPSGWNDCEGRA-IIGYCCKQ-	
Bc-III	-GVACRCDSDGPTSRGNTLTGTLWLTGGCPSGWHNCRGSGPFIGYCCKK-	
Bg-2	-GASCRCDSDGPTSRGNTLTGTLWLIGRCPSGWHNCRGSGPFIGYCCKQ-	
Bg-3	-GASCRCDSDGPTSRGDTLTGTLWLIGRCPSGWHNCRGSGPFIGYCCKQ-	
CGTX	-GVACRCDSDGPTVRGNSLSGTLWLTGGCPSGWHNCRGSGPFIGYCCKK-	
CGTX-II	-GVACRCDSDGPTVRGDSLSGTLWLTGGCPSGWHNCRGSGPFIGYCCKK-	
CGTX-III	-GVACRCDSDGPTVHGDSLSGTLWLTGGCPSGWHNCRGSGPFIGYCCKK-	
Bcg30.24	-GVPCLCDSDGPSVRGNTLSGTVWVFGCPSGWHICTSDGPTIGSCCKK-	
APE1-1	-GIACLCDSDGPSVRGNTLSGTYWLAGCPSGWHNCKSSGQLIGACCKQ-	
APE1-2	-GVPCLCDSDGPNVRGNTLSGTYWLAGCPSGWHNCKSSGPLIGACCKQ-	
PCR1-2	-GVPCLCDSDGPNVRGNTLSGTYWLAGCPSGWHNCKSSGPNIGWCCKK-	
PCR2-10	-GVPCLCDSDGPSVRGNSLSGIIWLFGCPSGWHNCRDHGPTIGWCCKK-	
Hk16a	-GVPCLCDSDGPSVRGNTLSGTLWLFGCPSGWHNCKAHGPTIGWCCKK-	
Hk8a	-GVPCLCDSDGPSVRGNTLSGTLWLFGCPSGWHNCKARGPTIGWCCKK-	
Hk2a	-GVPCLCDSDGPSVRGNTLSGTLWLAGCPSGWHNCKAHGPTIGWCCKK-	
Hk7a	-GVPCLCDSDGPSVHGNTLSGTIWLAGCPSGWHNCKAHGPTIGWCCKK-	
АрА	-GVSCLCDSDGPSVRGNTLSGTLWLYPSGCPSGWHNCKAHGPTIGWCCKQ-	
PCR3-7	-GVSCLCDSDGPSVRGNTLSGILWFYPSGCPSGWHNCKAHGPTIGWCCKQ-	
ApB	-GVPCLCDSDGPRPRGNTLSGILWFYPSGCPSGWHNCKAHGPNIGWCCKK-	
PCR2-1	-GAACFCDSDGPSVSGNTLSGILWLAGCPSGWHNCKAHGPNIGWCCKK-	
PCR2-5	-GVACLCDADGPSVSGNTLSGILWLAGCPSGWHNCKAHGPTIGWCCKK-	
PCR3-6	-GVSCLCDSDGPSVSGNTLSGIIWLAGCPSGWHNCKAHGPNIGWCCKK-	
AFT-I	-GVACLCDSDGPNVRGNTLSGTIWLAGCPSGWHNCKAHGPTIGWCCKQ-	
APE2-1	-GVPCLCDSDGPSVRGNTLSGILWLAGCPSGWHNCKAHGPTIGWCCKQ-	
APE2-2	-GVPCLCDSDGPNVRGNTLSGILWLAGCPSGWHNCKAHGPTIGWCCKQ-	
AFT-II	GGVPCLCDSDGPSVRGNTLSGIIWLAGCPSGWHNCKAHGPTIGWCCKQ-	
ATX-II	-GVPCLCDSDGPSVRGNTLSGIIWLAGCPSGWHNCKKHGPTIGWCCKQ-	
Av2	-GIPCLCDSDGPSVRGNTLSGIIWLAGCPSGWHNCKKHGPTIGWCCKQ-	
ATX-V	-GVPCLCDSDGPSVRGNTLSGILWLAGCPSGWHNCKKHKPTIGWCCK	

Нейротоксины Ae1-1 (UniProt ID: Q9NJQ2), Ae 4-1 (B1NWU6), Ae2-1 (B1NWU2), Ae2-2 (B1NWU3), Ae2-3 (B1NWU4), Ae3-1 (B1NWU5) из Actinia equina, Am-3 (P69928) из Antheopsis maculata, Rc-1 (P0C5G5) из Heteractis crispa, CgNa (P0C280), Cp-1(P0CH42), Cp-2 (P0DMX1) из Condylactis gigantea, Gigantoxin-2 (Q76CA3) из Stichodactyla gigantea, APE1-1 (P0C1F0), AETX-1 (P69943) из Anemonia erythraea, ATX-Ia (P01533), ATX-Ib (A0A0S1M165), ATX-II (P01528), ATX-V (P01529) из Anemonia sulcata, Bc-III (Q7M425) из Bunodosoma caissarum, Bg-2 (P0C1F4), Bg-3 (P0C1F5) из Bunadosoma granulifera, CGTX (P82803), CGTX-II (P0C7P9), CGTX-III (P0C7Q0), Bcg 30.24 (P86459) из Bunodosoma cangicum, APE1-2 (P0C1F1), APE2-1 (P01532), APE2-2 (P0C1F3) из Anthopleura elegantissima, PCR1-2 (P0C5F8), PCR2-10 (P0C5G1), PCR 3-7 (P0C5G3), PCR2-1 (P0C5G0), PCR2-5 (P0C5F9), PCR3-6 (P0C5G2) из Anthopleura xanthogrammica, Hk16a (P0C5F7), Hk8a (P0C5F6), Hk2a (P0C5F4), Hk7a (P0C5F5) из Anthopleura sp., ApA (P01530), ApB (P01531), Av2 (P0DL52) из Anemonia viridis, AFT-I (P10453), AFT-II (P10454) из Anthopleura fuscoviridis. Ha темно-сером фоне показаны идентичные аминокислотные остатки, на светло-сером – подобные; выравнивание выполнено с помощью программы Vector NTI

Рисунок 1 – Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей нейротоксинов актиний – модуляторов Nav каналов, структурного типа 1

CaI	VACKCDDDGPDVRSATFTGTVDLGSCNSGWEKCASYYTVIADCCRKPRG
Rp-II	ASCKCDDDGPDVRSATFTGTVDFWNCNEGWEKCTAVYTPVASCCRKKK-
RTX-I	ASCKCDDDGPDVRSATFTGTVDFAYCNAGWEKCLAVYTPVASCCRKKK-
RTX-II	GTCKCDDDGPDVRTATFTGSTEFANCNESWEKCLAVYTPVASCCRKKK-
SHTX-IV	AACKCDDDGPDIRSATLTGTVDFWNCNEGWEKCTAVYTAVASCCRKKK-
Rp-III	GNCKCDDEGPNVRTAPLTGYVDLGYCNEGWEKCASYYSPIAECCRKKK-
RTX-VI	GNCKCDDEGPNVRTAPLTGYVDLGYCNEGWDKCASYYSPIAECCRKKK-
RTX-V	GNCKCDDEGPNVRTAPLTGYVDLGYCNEGWEKCASYYSPIAECCRKK
RTX-III	GNCKCDDEGPYVRTAPLTGYVDLGYCNEGWEKCASYYSPIAECCRKKK-
ShI	AACKCDDEGPDIRTAPLTGTVDLGSCNAGWEKCASYYTIIADCCRKKK-
Gigantoxin-3	AACKCDDDGPDIRSATLTGTVDLGSCNEGWEKCASFYTILADCCRRPR-
Hh1	VACKCDDDGPDIRSATLTGTVDLGSCNEGWEKCASYYTVVADCCRRPRS
TaI	VACKCDDDGPDIRSATLTGTVDLGSCDEGWEKCASYYTVIADCCRRPRS

Нейротоксины Cal (D2KX90) из *Cryptodendrum adhaesivum*, Rp-II (P01534), Rp-III (P08380) из *H. magnifica*, RTX-I (P30831), RTX-II (P30783), RTX-III (P30832), RTX-IV (P30784) и RTX-V (P30785) из *H. crispa*, SHTX-IV (B1B5I9) из *S. haddoni*, и Sh1 (P19651) из *S. helianthus*, Gigantoxin-3 (Q76CA0) из Stichodactyla gigantea, Hh1 (D2KX91) из Heterodactyla hemprichii, Tal (D2KX92) из Thalassianthus aster

Рисунок 2 – Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей нейротоксинов актиний – модуляторов Nav каналов, структурного типа 2

### Список литературы

- Frazão B., Vasconcelos V., Antunes A. Sea anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) toxins: An overview // Mar. Drugs. 2012. Vol. 10, № 12. P. 1812–1851.
- Prentis P.J., Pavasovic A., Norton R.S. Sea anemones: Quiet achievers in the field of peptide toxins // Toxins. 2018. Vol. 10, № 1. P. 36.
- Ashwood L.M., Norton R.S., Undheim E.A.B., et al. Characterising functional venom profiles of anthozoans and medusozoans within their ecological context // Mar. Drugs. 2020. Vol. 18, № 4. P. 202.
- Madio B., King G.F., Undheim E.A.B. Sea anemone toxins: A structural overview // Mar. Drugs. 2019. Vol. 17, № 6. P. 325.
- Monastyrnaya M.M., Kalina R.S., Kozlovskaya E.P. Pharmacologically active peptides of the sea anemone *Heteractis crispa* and their biological templates // Biomed. J. Sci. Tech. Res. 2019. Vol. 20, № 3. P. 15115–15120.
- Macrander J., Brugler M.R., Daly M. A RNA-seq approach to identify putative toxins from acrorhagi in aggressive and non-aggressive Anthopleura elegantissima polyps // BMC Genomics. 2015. Vol. 16, № 1. P. 221.
- Isaeva M.P., Chausova V.E., Zelepuga E.A., et al. A new multigene superfamily of Kunitz-type protease inhibitors from sea anemone *Heteractis crispa* // Peptides. 2012. Vol. 34, № 1. P. 88–97.
- 8. Leychenko E., Chausova V.E., Zelepuga E.A., et al. Multigene family of pore-forming toxins from sea anemone *Heteractis crispa* // Mar. Drugs. 2018. Vol. 16, № 6. P. 183.
- Macrander J., Broe M., Daly M. Tissue-specific venom composition and differential gene expression in sea anemones // Genome Biol. Evol. 2016. Vol. 8, № 8. P. 2358–2375.
- Rachamim T., Morgenstern D., Aharonovich D., et al. The dynamically evolving nematocyst content of an Anthozoan, a Scyphozoan, and a Hydrozoan // Mol. Biol. Evol. 2015. Vol. 32, № 3. P. 740–753.
- 11. Миков А.Н., Козлов С.А. Структурные особенности цистеин-богатых полипептидов из ядов морских анемон // Биоорг. Хим. 2015. Vol. 41, № 5. Р. 511–523.
- 12. Clairfeuille T., Xu H., Koth C.M., et al. Voltage-gated sodium channels viewed through a structural biology lens // Curr. Opin. Struct. Biol. 2017. Vol. 45. P. 74–84.
- 13. Zhi-Mei L., Li-Xia C., Hua L. Voltage-gated sodium channels and blockers: Anoverview and where will they go? // Curr. Med. Sci. 2019. Vol. 39, № 6. P. 863–873.
- 14. Catterall W.A. Forty years of sodium channels: structure, function, pharmacology, and epilepsy // Neurochem. Res. 2017. Vol. 42, № 9. P. 2495–2504.

- Wang J., Ou S., Wang Y. Distribution and function of voltage-gated sodium channels in the nervous system // Channels. 2017. Vol. 11, № 6. P. 534–554.
- 16. Marban E., Yamagishi T., Tomaselli G.F. Structure and function of voltage-gated sodium channels // J. Physiol. 1998. Vol. 508, № 3. P. 647–657.
- 17. Laedermann C.J., Abriel H., Decosterd I. Post-translational modifications of voltage-gated sodium channels in chronic pain syndromes // Front. Pharmacol. 2015. Vol. 6. P. 263.
- Marionneau C., Abriel H. Regulation of the cardiac Na<sup>+</sup> channel Na<sub>v</sub>1.5 by posttranslational modifications // J. Mol. Cell. Cardiol. 2015. Vol. 82. P. 36–47.
- Yu F.H., Catterall W.A. Overview of the voltage-gated sodium channel family // Genome Biology. 2003. Vol. 4, № 3. P. 207.
- Catterall W.A., Goldin A.L., Waxman S.G. International union of pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels // Pharmacol. Rev. 2005. Vol. 57, № 4. P. 397–409.
- 21. Ahern C.A., Payandeh J., Bosmans F., et al. The hitchhiker's guide to the voltage-gated sodium channel galaxy // J. Gen. Physiol. 2016. Vol. 147, № 1. P. 1–24.
- 22. Payandeh J., Scheuer T., Zheng N., et al. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel // Nature. 2011. Vol. 475. P. 353–358.
- Oelstrom K., Goldschen-Ohm M.P., Holmgren M., et al. Evolutionarily conserved intracellular gate of voltage-dependent sodium channels // Nat. Commun. 2014. Vol. 5. P. 3420.
- 24. Shen H., Liu D., Wu K., et al. Structures of human Na<sub>v</sub>1.7 channel in complex with auxiliary subunits and animal toxins // Science. 2019. Vol. 363. P. 1303–1308.
- 25. Xu L., Ding X., Wang T., et al. Voltage-gated sodium channels: structures, functions, and molecular modeling // Drug Discov. Today. 2019. Vol. 24, № 7. P. 1389–1397.
- Armstrong C.M. Na channel inactivation from open and closed states // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2006. Vol. 103, № 47. P. 17991–17996.
- Capes D.L., Goldschen-Ohm M.P., Arcisio-Miranda M., et al. Domain IV voltage-sensor movement is both sufficient and rate limiting for fast inactivation in sodium channels // J. Gen. Physiol. 2013. Vol. 142, № 2. P. 101–112.
- Lacroix J.J., Campos F.V., Frezza L., et al. Molecular bases for the asynchronous activation of sodium and potassium channels required for nerve impulse generation // Neuron. 2013. Vol. 79, № 4. P. 651–657.
- Catterall W.A., Wisedchaisri G., Zheng N. The chemical basis for electrical signaling // Nat. Chem. Biol. 2017. Vol. 13, № 5. P. 455–463.
- 30. Gamal El-Din T.M., Lenaeus M.J., Catterall W.A. Structural and functional analysis of

sodium channels viewed from an evolutionary perspective // Handb. Exp. Pharmacol. 2017. Vol. 246. P. 53–72.

- Ulbricht W. Sodium channel inactivation: Molecular determinants and modulation // Physiol. Rev. 2005. Vol. 85, № 4. P. 1271–1301.
- 32. Capes D.L., Arcisio-Miranda M., Jarecki B.W., et al. Gating transitions in the selectivity filter region of a sodium channel are coupled to the domain IV voltage sensor // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2012. Vol. 109, № 7. P. 2648–2653.
- 33. Stevens M., Peigneur S., Tytgat J. Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels // Front. Pharmacol. 2011. Vol. 2. P. 71.
- 34. Wu Y., Ma H., Zhang F., et al. Selective voltage-gated sodium channel peptide toxins from animal venom: Pharmacological probes and analgesic drug development // ACS Chem. Neurosci. 2018. Vol. 9, № 2. P. 187–197.
- Israel M.R., Tay B., Deuis J.R., et al. Sodium channels and venom peptide pharmacology // Adv. Pharmacol. 2017. Vol. 79. P. 67–116.
- 36. Ahuja S., Mukund S., Deng L., et al. Structural basis of Na<sub>V</sub>1.7 inhibition by an isoformselective small-molecule antagonist // Science. 2015. Vol. 350, № 6267. P. aac5464.
- 37. Fozzard H.A., Lipkind G.M. The tetrodotoxin binding site is within the outer vestibule of the sodium channel // Mar. Drugs. 2010. Vol. 8, № 2. P. 219–234.
- 38. Al-Sabi A., McArthur J., Ostroumov V., et al. Marine toxins that target voltage-gated sodium channels // Mar. Drugs. 2006. Vol. 4, № 3. P. 157–192.
- Pan X., Li Z., Huang X., et al. Molecular basis for pore blockade of human Na<sup>+</sup> channel Na<sub>v</sub>1.2 by the μ-conotoxin KIIIA // Science. 2019. Vol. 363. P. 1309–1313.
- 40. Deuis J.R., Mueller A., Israel M.R., et al. The pharmacology of voltage-gated sodium channel activators // Neuropharmacol. 2017. Vol. 127. P. 87–108.
- Chugunov A.O., Koromyslova A.D., Berkut A.A., et al. Modular organization of α-toxins from scorpion venom mirrors domain structure of their targets, sodium channels // J. Biol. Chem. 2013. Vol. 288, № 26. P. 19014–19027.
- Clairfeuille T., Cloake A., Infield D.T., et al. Structural basis of α-scorpion toxin action on Na<sub>v</sub> channels // Science. 2019. Vol. 363, № 6433. P. eaav8573.
- 43. Shen H., Li Z., Jiang Y., et al. Structural basis for the modulation of voltage-gated sodium channels by animal toxins // Science. 2018. Vol. 362. P. eaau2596.
- Escalona M.P., Possani L.D. Scorpion beta-toxins and voltage-gated sodium channels: Interactions and effects // Front. Biosci. 2013. Vol. 18, № 2. P. 572–587.
- 45. Tietze D., Leipold E., Heimer P., et al. Molecular interaction of δ-conopeptide EVIA with voltage-gated Na<sup>+</sup> channels // Biochim. Biophys. 2016. Vol. 1860, № 9. P. 2053–2063.

- 46. Du Y., Nomura Y., Zhorov B.S., et al. Evidence for dual binding sites for 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane (DDT) in insect sodium channels // J. Biol. Chem. 2016. Vol. 291, № 9. P. 4638–4648.
- 47. Zhorov B.S., Dong K. Elucidation of pyrethroid and DDT receptor sites in the voltagegated sodium channel // Neurotoxicology. 2017. Vol. 60. P. 171–177.
- 48. O'Leary M.E., Chahine M. Mechanisms of drug binding to voltage-gated sodium channels// Handb. Exp. Pharmacol. 2017. Vol. 246. P. 209–231.
- 49. Wanke E., Zaharenko A.J., Redaelli E., et al. Actions of sea anemone type 1 neurotoxins on voltage-gated sodium channel isoforms // Toxicon. Vol. 54, № 8. P. 1102–1111.
- 50. Hanck D.A., Sheets M.F. Site-3 toxins and cardiac sodium channels // Toxicon. 2007.
   Vol. 49, № 2. P. 181–193.
- Moran Y., Gordon D., Gurevitz M. Sea anemone toxins affecting voltage-gated sodium channels – molecular and evolutionary features // Toxicon. 2009. Vol. 54, № 8. P. 1089– 1101.
- 52. Jouiaei M., Sunagar K., Federman Gross A., 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. 2015. Vol. 32, № 6. P. 1598–1610.
- Moran Y., Weinberger H., Sullivan J.C., et al. Concerted evolution of sea anemone neurotoxin genes is revealed through analysis of the *Nematostella vectensis* genome // Mol. Biol. Evol. 2008. Vol. 25, № 4. P. 737–747.
- Messerli S.M., Greenberg R.M. Cnidarian toxins acting on voltage-gated ion channels // Mar. Drugs. 2006. Vol. 4, № 3. P. 70.
- 55. Moran Y., Kahn R., Cohen L., et al. Molecular analysis of the sea anemone toxin Av3 reveals selectivity to insects and demonstrates the heterogeneity of receptor site-3 on voltage-gated Na<sup>+</sup> channels // Biochem. J. 2007. Vol. 406, № 1. P. 41–48.
- 56. Bosmans F., Tytgat J. Sea anemone venom as a source of insecticidal peptides acting on voltage-gated Na<sup>+</sup> channels // Toxicon. 2007. Vol. 49, № 4. P. 550–560.
- 57. Rogers J.C., Qu Y., Tanada T.N., et al. Molecular determinants of high affinity binding of α-scorpion toxin and sea anemone toxin in the S3-S4 extracellular loop in domain IV of the Na<sup>+</sup> channel α subunit // J. Biol. Chem. 1996. Vol. 271, № 27. P. 15950–15962.
- 58. Gilchrist J., Olivera B.M., Bosmans F. Animal toxins influence voltage-gated sodium channel function // Handb. Exp. Pharmacol. 2014. Vol. 221. P. 203–229.
- 59. Benzinger G.R., Kyle J.W., Blumenthal K.M., et al. A specific interaction between the cardiac sodium channel and site-3 toxin anthopleurin B // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273,

№ 1. P. 80–84.

- Xiao Y., Blumenthal K., Cummins T.R. Gating-pore currents demonstrate selective and specific modulation of individual sodium channel voltage-sensors by biological toxins // Mol. Pharmacol. 2014. Vol. 86, № 2. P. 159–167.
- 61. Seibert A.L., Liu J., Hanck D.A., et al. Role of Asn-16 and Ser-19 in Anthopleurin B binding. Implications for the electrostatic nature of Na<sub>V</sub> Site 3 // Biochemistry. 2004. Vol. 43, № 22. P. 7082–7089.
- Seibert A.L., Liu J., Hanck D.A., et al. Arg-14 loop of site 3 anemone toxins: Effects of glycine replacement on toxin affinity // Biochemistry. 2003. Vol. 42, № 49. P. 14515–14521.
- Khera P.K., Benzinger G.R., Lipkind G., et al. Multiple cationic residues of Anthopleurin B that determine high affinity and channel isoform discrimination // Biochemistry. 1995. Vol. 34, № 27. P. 8533–8541.
- 64. Khera P.K., Blumenthal K.M. Importance of highly conserved anionic residues and electrostatic interactions in the activity and structure of the cardiotonic polypeptide Anthopleurin B // Biochemistry. 1996. Vol. 35, № 11. P. 3503–3507.
- 65. Moran Y., Cohen L., Kahn R., et al. Expression and mutagenesis of the sea anemone toxin Av2 reveals key amino acid residues important for activity on voltage-gated sodium channels // Biochemistry. 2006. Vol. 45, № 29. P. 8864–8873.
- 66. Wiemuth D., Assmann M., Gründer S. The bile acid-sensitive ion channel (BASIC), the ignored cousin of ASICs and ENaC // Channels. 2014. Vol. 8, № 1. P. 29–34.
- 67. Lynagh T., Mikhaleva Y., Colding J.M., et al. Acid-sensing ion channels emerged over 600 Mya and are conserved throughout the deuterostomes // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2018. Vol. 115, № 33. P. 8430–8435.
- Wu J., Xu Y., Jiang Y., et al. ASIC subunit ratio and differential surface trafficking in the brain // Mol. Brain. 2016. Vol. 9, № 1. P. 4.
- 69. Deval E., Gasull X., Noël J., et al. Acid-sensing ion channels (ASICs): Pharmacology and implication in pain // Pharmacol. 2010. Vol. 128, № 3. P. 549–558.
- Kweon H.J., Kim D.I., Bae Y., et al. Acid-sensing ion channel 2a (ASIC2a) promotes surface trafficking of ASIC2b via heteromeric assembly // Sci. Rep. 2016. Vol. 6, № 1. P. 30684.
- Gründer S., Pusch M. Biophysical properties of acid-sensing ion channels (ASICs) // Neuropharmacology. 2015. Vol. 94. P. 9–18.
- Rash L.D. Acid-sensing ion channel pharmacology, past, present, and future ... // Adv. Pharmacol. 2017. Vol. 79. P. 35–66.

- 73. Soto E., Ortega-Ramírez A., Vega R. Protons as messengers of intercellular communication in the nervous system // Front. Cell. Neurosci. 2018. Vol. 12. P. 342.
- Lin S.H., Sun W.H., Chen C.C. Genetic exploration of the role of acid-sensing ion channels // Neuropharmacology. 2015. Vol. 94. P. 99–118.
- 75. Barth D., Fronius M. Shear force modulates the activity of acid-sensing ion channels at low pH or in the presence of non-proton ligands // Sci. Rep. Nature. 2019. Vol. 9, № 1. P. 6781.
- Pattison L.A., Callejo G., Smith E.S.J. Evolution of acid nociception: Ion channels and receptors for detecting acid // Philos. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci. 2019. Vol. 374, P. 20190291.
- Ortega-Ramírez A., Vega R., Soto E. Acid-sensing ion channels as potential therapeutic targets in neurodegeneration and neuroinflammation // Mediators Inflamm. 2017. Vol. 2017. P. 1–18.
- 78. Chassagnon I.R., McCarthy C.A., Chin Y.K-Y., et al. Potent neuroprotection after stroke afforded by a double-knot spider-venom peptide that inhibits acid-sensing ion channel 1a // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2017. Vol. 114, № 14. P. 3750–3755.
- 79. Uchitel O.D., González I.C., Weissmann C. Synaptic signals mediated by protons and acid-sensing ion channels // Synapse. 2019. Vol. 73, № 10. P. e22120.
- Gautam M., Benson C.J. Acid-sensing ion channels (ASICs) in mouse skeletal muscle afferents are heteromers composed of ASIC1a, ASIC2, and ASIC3 subunits // FASEB J. 2013. Vol. 27, № 2. P. 793–802.
- 81. Vullo S., Kellenberger S. A molecular view of the function and pharmacology of acidsensing ion channels // Pharmacol. Res. 2019. Vol. 154. P. 104166.
- Jasti J., Furukawa H., Gonzales E.B., et al. Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH // Nature. 2007. Vol. 449. P. 316–323.
- Yoder N., Yoshioka C., Gouaux E. Gating mechanisms of acid-sensing ion channels // Nature. 2018. Vol. 555. P. 397–401.
- Rook M.L., Musgaard M., MacLean D.M. Coupling structure with function in acid-sensing ion channels: challenges in pursuit of proton sensors // J. Physiol. 2020. Vol. 599, N

   № 2. P. 417–430.
- Vullo S., Bonifacio G., Roy S., et al. Conformational dynamics and role of the acidic pocket in ASIC pH-dependent gating // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2017. Vol. 114, № 14. P. 3768–3773.
- 86. Osmakov D.I., Khasanov T.A., Andreev Y.A., et al. Animal, herb, and microbial toxins for structural and pharmacological study of acid-sensing ion channels // Front. Pharmacol.

2020. Vol. 11. P. 991.

- Baconguis I., Bohlen C.J., Goehring A., et al. X-Ray structure of acid-sensing ion channel 1–snake toxin complex reveals open state of a Na<sup>+</sup>-selective channel // Cell. 2014. Vol. 156, № 4. P. 717–729.
- 88. Yu H., Yang L., Liu L., et al. Molecular dynamics simulations investigate the mechanism of Psalmotoxin 1 regulating gating process of an acid-sensing ion channel 1a at pH 5.5 // J. Biomol. Struct. Dyn. 2018. Vol. 36, № 10. P. 2558–2566.
- Wu Y., Chen Z., Canessa C.M. A valve-like mechanism controls desensitization of functional mammalian isoforms of acid-sensing ion channels // Elife. 2019. Vol. 8. P. e45851.
- Cristofori-Armstrong B., Rash L.D. Acid-sensing ion channel (ASIC) structure and function: Insights from spider, snake and sea anemone venoms // Neuropharmacology. 2017. Vol. 127. P. 173–184.
- 91. Escoubas P., De Weille J.R., Lecoq A., et al. Isolation of a tarantula toxin specific for a class ofproton-gated Na<sup>+</sup> channels // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275, № 33. P. 25116–25121.
- 92. Saez N.J., Deplazes E., Cristofori-Armstrong B., et al. Molecular dynamics and functional studies define a hot spot of crystal contacts essential for PcTx1 inhibition of acid-sensing ion channel 1a // Br. J. Pharmacol. 2015. Vol. 172, № 20. P. 4985–4995.
- Baconguis I., Gouaux E. Structural plasticity and dynamic selectivity of acid-sensing ion channel–spider toxin complexes // Nature. 2012. Vol. 489. P. 400–405.
- 94. Er S.Y., Cristofori-Armstrong B., Escoubas P., et al. Discovery and molecular interaction studies of a highly stable tarantula peptide modulator of acid-sensing ion channel 1 // Neuropharmacology. 2017. Vol. 127. P. 185–195.
- 95. Baron A., Diochot S., Salinas M., et al. Venom toxins in the exploration of molecular, physiological and pathophysiological functions of acid-sensing ion channels // Toxicon. 2013. Vol. 75. P. 187–204.
- 96. Cristofori-armstrong B., Saez N.J., Chassagnon I.R., et al. The modulation of acid-sensing ion channel 1 by PcTx1 is pH-, subtype- and species-dependent: importance of interactions at the channel subunit interface and potential for engineering selective analogues // Biochem. Pharmacol. 2019. Vol. 163. P. 381–390.
- Liu Y., Hagan R., Schoellerman J. Dual actions of Psalmotoxin at ASIC1a and ASIC2a heteromeric channels (ASIC1a/2a) // Sci. Rep. 2018. Vol. 8. P. 7179.
- Osmakov D.I., Kozlov S.A., Andreev Y.A., et al. Sea anemone peptide with uncommon βhairpin structure inhibits acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) and reveals analgesic
activity // J. Biol. Chem. 2013. Vol. 288, № 32. P. 23116-23127.

- 99. Diochot S., Baron A., Rash L.D., et al. A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons // EMBO J. 2004. Vol. 23, № 7. P. 1516–1525.
- Diochot S., Baron A., Salinas M., et al. Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain // Nature. 2012. Vol. 490. P. 552–555.
- 101. Козлов С.А., Осмаков Д.И., Андреев Я.А., и др. Полипептидный токсин из морской анемоны, ингибирующий протнчувствительный канал ASIC3 // Биоорг. Хим. 2012. Т. 38, № 6. С. 578–583.
- 102. Chen X., Kalbacher H., Gründer S. Interaction of acid-sensing ion channel (ASIC1) with the tarantula toxin psalmotoxin 1 is state dependent // J Gen Physiol. 2006. Vol. 127, № 3. P. 267–276.
- 103. Bohlen C.J., Chesler A.T., Sharif-Naeini R., et al. A heteromeric Texas coral snake toxin targets acid-sensing ion channels to produce pain // Nature. 2011. Vol. 479. P. 410–414.
- 104. Joeres N., Augustinowski K., Neuhof A., et al. Functional and pharmacological characterization of two different ASIC1a/2a heteromers reveals their sensitivity to the spider toxin PcTx1 // Nature. 2016. Vol. 6. P. 27647.
- 105. Dibas J., Al-Saad H., Dibas A. Basics on the use of acid-sensing ion channels' inhibitors as therapeutics // Neural Regen. Res. 2019. Vol. 14, № 3. P. 395.
- 106. Smith R.N., Gonzales E.B. Protons and Psalmotoxin-1 reveal nonproton ligand stimulatory sites in chicken acid-sensing ion channel // Channels. 2014. Vol. 8, № 1. P. 49–61.
- 107. Sun D., Yu Y., Xue X., et al. Cryo-EM structure of the ASIC1a-mambalgin-1 complex reveals that the peptide toxin mambalgin-1 inhibits acid-sensing ion channels through an unusual allosteric effect // Cell Discov. 2018. Vol. 4, № 1. P. 27.
- 108. Schroeder C.I., Rash L.D., Vila-Farrés X., et al. Chemical synthesis, 3D structure, and ASIC binding site of the toxin Mambalgin-2 // Angew. Chemie Int. Ed. Engl. 2014. Vol. 53, № 4. P. 1017–1020.
- Diochot S., Alloui A., Rodrigues P., et al. Analgesic effects of mambalgin peptide inhibitors of acid-sensing ion channels in inflammatory and neuropathic pain // Pain. 2016. Vol. 157, № 3. P. 552–559.
- Salinas M., Besson T., Delettre Q., et al. Binding site and inhibitory mechanism of the Mambalgin-2 pain-relieving peptide on acid-sensing ion channel 1a // J. Biol. Chem. 2014. Vol. 289, № 19. P. 13363–13373.
- 111. Mourier G., Salinas M., Kessler P., et al. Mambalgin-1 pain-relieving peptide, stepwise

solid-phase synthesis, crystal structure, and functional domain for acid-sensingion channel 1a inhibition // J. Biol. Chem. 2016. Vol. 291, № 6. P. 2616–2629.

- 112. Harvey A.L. Twenty years of dendrotoxins // Toxicon. 2001. Vol. 39, № 1. P. 15–26.
- Báez A., Salceda E., Fló M., et al. α-Dendrotoxin inhibits the ASIC current in dorsal root ganglion neurons from rat // Neurosci. Lett. 2015. Vol. 606. P. 42–47.
- Skarżyński T. Crystal structure of α-dendrotoxin from the green mamba venom and its comparison with the structure of bovine pancreatic trypsin inhibitor // J. Mol. Biol. 1992. Vol. 224, № 3. P. 671–683.
- 115. Margenat M., Pellizza L., Dura R., et al. Functional diversity of secreted cestode Kunitz proteins: Inhibition of serine peptidases and blockade of cation channels // PLoS Pathog. 2017. Vol. 13, № 2. P. e1006169.
- 116. Rodríguez A.A., Salceda E., Garateix A.G., et al. A novel sea anemone peptide that inhibits acid-sensing ion channels // Peptides. 2014. Vol. 53. P. 3–12.
- 117. Osmakov D.I., Koshelev S.G., Andreev Y.A., et al. Conversed mutagenesis of an inactive peptide to ASIC3 inhibitor for active sites determination // Toxicon. 2016. Vol. 116. P. 11–16.
- 118. Jensen J.E., Cristofori-Armstrong B., Anangi R., et al. Understanding the molecular basis of toxin promiscuity: The analgesic sea anemone peptide APETx2 interacts with acidsensing ion channel 3 and hERG channels via overlapping pharmacophores // J. Med. Chem. 2014. Vol. 57, № 21. P. 9195–9203.
- Chagot B., Escoubas P., Diochot S., et al. Solution structure of APETx2, a specific peptide inhibitor of ASIC3 proton-gated channels // Protein Sci. 2005. Vol. 14, № 8. P. 2003–2010.
- 120. Lee J.Y.P., Saez N.J., Cristofori-Armstrong B., et al. Inhibition of acid-sensing ion channels by diminazene and APETx2 evoke partial and highly variable antihyperalgesia in a rat model of inflammatory pain // Br. J. Pharmacol. 2017. Vol. 175, № 12. P. 2204– 2218.
- 121. Peigneur S., Beress L., Moller C., et al. A natural point mutation changes both target selectivity and mechanism of action of sea anemone toxins // FASEB J. 2012. Vol. 26, № 12. P. 5141–5151.
- 122. Andreev Y., Beress L., Moller C., et al. Analgesic activity of acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) inhibitors: Sea anemonespeptides Ugr9-1 and APETx2 versus low molecular weight compounds // Mar. Drugs. 2018. Vol. 16, № 12. P. 500.
- 123. Xu S., Tu W., Wen J., et al. The selective ASIC3 inhibitor APETx2 alleviates gastric mucosal lesion in the rat // Pharmazie. 2014. Vol. 69, № 7. P. 542–546.

- Kalina R., Gladkikh I., Dmitrenok P., et al. New APETx-like peptides from sea anemone *Heteractis crispa* modulate ASIC1a channels // Peptides. 2018. Vol. 104. P. 41–49.
- 125. Kalina R.S., Peigneur S., Zelepuga E.A., et al. New insights into the type II toxins from the sea anemone *Heteractis crispa* // Toxins. 2020. Vol. 12, № 1. P. 44.
- 126. Kalina R.S., Koshelev S.G., Zelepuga E.A., et al. APETx-like peptides from the sea anemone *Heteractis crispa*, diverse in their effect on ASIC1a and ASIC3 ion channels // Toxins. 2020. Vol. 12, № 4. P. 266.
- 127. Yamanaka S., Hashimoto M., Tobe M., et al. A simple method for screening assessment of acute toxicity of chemicals // Arch. Toxicol. 1990. Vol. 64, № 4. P. 262–268.
- 128. Nedosyko A.M., Young J.E., Edwards J.W., et al. Searching for a toxic key to unlock the mystery of anemonefish and anemone symbiosis // PLoS One. 2014. Vol. 9, № 5. P. 98449.
- 129. Il'ina A., Lipkin A., Barsova E., et al. Amino acid sequence of RTX-A's isoform actinoporin from the sea anemone, *Radianthus macrodactylus* // Toxicon. 2006. Vol. 47, N
  <u>0</u> 5. P. 517–520.
- Monastyrnaya M.M., Zykova T.A., Apalikova O.V., et al. Biologically active polypeptides from the tropical sea anemone *Radianthus macrodactylus* // Toxicon. 2002. Vol. 40, № 8. P. 1197–1217.
- 131. Monastyrnaya M., Leychenko E., Isaeva M., et al. Actinoporins from the sea anemones, tropical *Radianthus macrodactylus* and northern *Oulactis orientalis*: Comparative analysis of structure-function relationships // Toxicon. 2010. Vol. 56, № 8. P. 1299–1314.
- 132. Fedorov S., Dyshlovoy S., Monastyrnaya M., et al. The anticancer effects of actinoporin RTX-A from the sea anemone *Heteractis crispa* (=*Radianthus macrodactylus*) // Toxicon. 2010. Vol. 55, № 4. P. 811–817.
- 133. Зыкова Т.А., Винокуров Л.М., Маркова Л.Ф., и др. Аминокислотная последовательность трипсинового ингибитора IV из Radianthus macrodactylus // Биоорг. Хим. 1985. № 11. Р. 293–301.
- 134. Gladkikh I., Monastyrnaya M., Leychenko E., et al. Atypical reactive center Kunitz-type inhibitor from the sea anemone *Heteractis crispa* // Mar. Drugs. 2012. Vol. 10, № 12. P. 1545–1565.
- 135. Синцова О.В., Паликов В.А., Паликова Ю.А., и д.р. Пептидный блокатор ионного канала TRPV1 проявляет длительный анальгетический эффект в модели тепловой стимуляции // Докл. РАН. Науки о жизни. 2020. Т. 493, № 1. С. 423–426.
- 136. Andreev Y.A., Kozlov S.A., Koshelev S.G., et al. Analgesic compound from sea anemone *Heteractis crispa* is the first polypeptide inhibitor of vanilloid receptor 1 (TRPV1) // J.

Biol. Chem. 2008. Vol. 283, № 35. P. 23914–23921.

- 137. Monastyrnaya M., Peigneur S., Zelepuga E., et al. Kunitz-type peptide HCRG21 from the sea anemone *Heteractis crispa* is a full antagonist of the TRPV1 receptor // Mar. Drugs. 2016. Vol. 14, № 12. P. 229.
- 138. Зыкова Т.А., Козловская Э.П. Аминокислотная последовательность нейротоксина I из актинии *Radianthus macrodactylus* // Биоорг. Хим. 1989. Т. 15, № 10. С. 1301– 1306.
- Зыкова Т.А., Козловская Э.П., Еляков Г.Б. Аминокислотная последовательность нейротоксина II из актинии *Radianthus macrodactylus* // Биоорг. Хим. 1988. Т. 14, № 7. С. 878–882.
- 140. Зыкова Т.А., Винокуров Л.М., Козловская Э.П., и д.р. Аминокислотная последовательность нейротоксина III из актинии *Radianthus macrodactylus* // Биоорг. Хим. 1985. Т. 11, № 3. С. 302–310.
- 141. Зыкова Т.А., Козловская Э.П., Еляков Г.Б. Аминокислотные последовательности нейротоксинов IV и V из актинии *Radianthus macrodactylus* // Биоорг. Хим. 1988. Т. 14, № 11. С. 1489–1494.
- 142. Rodríguez A.A., Cassoli J.S., Sa F., et al. Peptide fingerprinting of the neurotoxic fractions isolated from the secretions of sea anemones *Stichodactyla helianthus* and *Bunodosoma granulifera*. New members of the APETx-like family identified by a 454 pyrosequencing approach // Peptides. 2012. Vol. 34, № 1. P. 26–38.
- 143. Tysoe C., Williams L.K., Keyzers R., et al. Potent human α-amylase inhibition by the βdefensin-like protein Helianthamide // ACS Cent. Sci. 2016. Vol. 2, № 3. P. 154–161.
- 144. Sintsova O., Gladkikh I., Chausova V., et al. Peptide fingerprinting of the sea anemone *Heteractis magnifica* mucus revealed neurotoxins, Kunitz-type proteinase inhibitors and a new β-defensin α-amylase inhibitor // J. Proteomics. 2017. № 173. P. 12–21.
- 145. Sintsova O., Gladkikh I., Kalinovskii A., et al. Magnificamide, a β-defensin-like peptide from the mucus of the sea anemone *Heteractis magnifica*, is a strong inhibitor of mammalian α-amylases // Mar. Drugs. 2019. Vol. 17, № 10. P. 542.
- Peigneur S., Billen B., Derua R., et al. A bifunctional sea anemone peptide with Kunitz type protease and potassium channel inhibiting properties // Biochem. Pharmacol. 2011. Vol. 82, № 1. P. 81–90.
- 147. Nicosia A., Mikov A., Cammarata M., et al. The Anemonia viridis venom: Coupling biochemical purification and RNA-seq for translational research // Mar. Drugs. 2018. Vol. 16, № 11. P. 407.
- 148. MacRander J., Broe M., Daly M. Multi-copy venom genes hidden in de novo

transcriptome assemblies, a cautionary tale with the snakelocks sea anemone *Anemonia sulcata* (Pennant, 1977) // Toxicon. 2015. Vol. 108. P. 184–188.

- 149. Babenko V.V., Mikov A.N., Manuvera V.A., et al. Identification of unusual peptides with new Cys frameworks in the venom of the cold-water sea anemone *Cnidopus japonicus* // Sci. Rep. 2017. Vol. 7, № 1. P. 14534.
- 150. Madio B., Undheim E.A.B., King G.F. Revisiting venom of the sea anemone Stichodactyla haddoni: Omics techniques reveal the complete toxin arsenal of a wellstudied sea anemone genus // J. Proteomics. 2017. Vol. 166. P. 83–92.
- Cassoli J.S., Verano-Braga T., Oliveira J.S., et al. The proteomic profile of *Stichodactyla duerdeni* secretion reveals the presence of a novel O-linked glycopeptide // J. Proteomics. 2013. Vol. 87. P. 89–102.
- 152. Schweitz H., Bidard J.N., Frelin C., et al. Purification, sequence, and pharmacological properties of sea anemone toxins from *Radianthus paumotensis*. A new class of sea anemone toxins acting on the sodium channel // Biochemistry. 1985. Vol. 24, № 14. P. 3554–3561.
- 153. Wemmer D.E., Kumar N.V., Metrione R.M., et al. NMR analysis and sequence of toxin II from the sea anemone *Radianthus paumotensis* // Biochemistry. 1986. Vol. 25, № 22. P. 6842–6849.
- 154. Banerjee S., Mazumdar S. Electrospray ionization mass spectrometry: A technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte // Int. J. Anal. Chem. 2012. Vol. 2012. P. 1–40.
- 155. Diochot S., Loret E., Bruhn T., et al. APETx1, a new toxin from the sea anemone anthopleura elegantissima, blocks voltage-gated human ether-a-go-go-related gene potassium channels // Mol. Pharmacol. 2003. Vol. 64, № 1. P. 59–69.
- 156. Moreels L., Peigneur S., Galan D.T., et al. APETx4, a novel sea anemone toxin and a modulator of the cancer-relevant potassium channel K<sub>v</sub>10.1 // Mar. Drugs. 2017. Vol. 15, Nº 9. P. 1–17.
- 157. Yeung S.Y.M., Thompson D., Wang Z., et al. Modulation of Kv3 subfamily potassium currents by the sea anemone toxin BDS: Significance for CNS and biophysical studies // J. Neurosci. 2005. Vol. 25, № 38. P. 8735–8745.
- 158. Liu P., Jo S., Bean B.P. Modulation of neuronal sodium channels by the sea anemone peptide BDS-I // J. Neurophysiol. 2012. Vol. 107, № 11. P. 3155–3167.
- 159. Honma T., Kawahata S., Ishida M., et al. Novel peptide toxins from the sea anemone Stichodactyla haddoni // Peptides. 2008. Vol. 29, № 4. P. 536–544.

- 160. Monks S.A., Gould A.R., Lumley P.E., et al. Limited proteolysis study of structurefunction relationships in Sh I, a polypeptide neurotoxin from a sea anemone // Biochim. Biophys. Acta. 1994. Vol. 1207, № 1. P. 93–101.
- Kuhn-Nentwig L., Schaller J., Schürch S., et al. Venom of *Cupiennius salei* (Ctenidae) // Spider Venoms. 2016. P. 47–70.
- 162. Mahnir V.M., Kozlovskaya E.P. Structure-toxicity relationships of neurotoxin RTX-III from the sea anemone *Radianthus macrodactylus*: Modification of amino groups // Toxicon. 1991. Vol. 29, № 7. P. 819–826.
- 163. Hinds M.G., Norton R.S. Sequential 1H-NMR assignments of neurotoxin III from the sea anemone *Heteractis macrodactylus* and structural comparison with related toxins // J. Protein Chem. 1993. Vol. 12, № 3. P. 371–378.
- 164. Norton R.S. Structures of sea anemone toxins // Toxicon. 2009. Vol. 54, № 8. P. 1075–1088.
- 165. Fogh R.H., Kem W.R., Norton R.S. Solution structure of neurotoxin I from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. A nuclear magnetic resonance, distance geometry, and restrained molecular dynamics study // J. Biol. Chem. 1990. Vol. 265, № 22. P. 13016– 13028.
- 166. Chagot B., Diochot S., Pimentel C., et al. Solution structure of APETx1 from the sea anemone Anthopleura elegantissima: a new fold for an HERG toxin // Proteins. 2005. Vol. 59, № 2. P. 380–386.
- 167. Driscoll P.C., Gronenborn A.M., Beress L., et al. Determination of the three-dimensional solution structure of the antihypertensive and antiviral protein BDS-I from the sea anemone *Anemonia sulcata*: a study using nuclear magnetic resonance and hybrid distance geometry-dynamical simulated annealing // Biochemistry. 1989. Vol. 28, № 5. P. 2188–2198.
- 168. Monks S.A., Pallaghy P.K., Scanlon M.J., et al. Solution structure of the cardiostimulant polypeptide anthopleurin-B and comparison with anthopleurin-A // Structure. 1995. Vol. 3, № 8. P. 791–803.
- Pallaghy P.K., Scanlon M.J., Monks S.A., et al. Three-dimensional structure in solution of the polypeptide cardiac stimulant anthopleurin-A // Biochemistry. 1995. Vol. 34, № 11. P. 3782–3794.
- 170. Reimers C., Lee C.H., Kalbacher H., et al. Identification of a cono-RF amide from the venom of *Conus textile* that targets ASIC3 and enhances muscle pain // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2017. Vol. 114, № 17. P. E3507–E3515.
- 171. Oliveira J.S., Redaelli E., Zaharenko A.J., et al. Binding specificity of sea anemone toxins

114

to Nav1.1-1.6 sodium channels. Unexpected contributions from differences in the IV/S3-S4 outer loop // J. Biol. Chem. 2004. Vol. 279, № 32. P. 33323–33335.

- 172. Zaharenko A.J., Schiavon E., Ferreira W.A., et al. Characterization of selectivity and pharmacophores of type 1 sea anemone toxins by screening seven Na<sub>V</sub> sodium channel isoforms // Peptides. 2012. Vol. 34, № 1. P. 158–167.
- 173. Billen B., Debaveye S., Béress L., et al. Phyla- and subtype-selectivity of CgNa, a Na<sup>+</sup> channel toxin from the venom of the Giant Caribbean Sea Anemone *Condylactis gigantea* // Front. Pharmacol. 2010. Vol. 1. P. 133.
- 174. Wagnon J.L., Bunton-Stasyshyn R.K., Meisler M.H. Mutations of sodium channel SCN8A (Nav1.6) in neurological disease // Ion Channels in Health and Disease. 2016. P. 239–264.
- 175. Mahnir V.M., Kozlovskaya E.P., Elyakov G.B. Modification of arginine in sea anemone toxin RTX-III from *Radianthus macrodactylus* // Toxicon. 1989. Vol. 27, № 10. P. 1075– 1084.
- 176. Сорокина З.А., Чижмаков И.В., Козловская Э.П., и д.р. Положительная кооперативность связывания тетродотоксина натриевыми каналами нейронов спинальных ганглиев крыс, индуцируемая анемонотоксином RTX-III // Докл. АН СССР. 1985. Т. 282, № 2. С. 433–436.
- 177. Козловская Э.П., Монастырная М.М., Гладких И.Н., и др. Полипептид из морской анемоны *Heteractis crispa*, обладающий анальгетическим действием: пат. 2475497 Российская Федерация, МПК С07С 14/435, А61К 38/17, А61Р 29/00. ТИБОХ ДВО РАН им. Г.Б. Елякова, ИБХ им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН № 2012108499, Заявл. 05.03.2012; Опубл. 20.02.2013.