



УДК 577.112.5

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЦИСТЕИН-БОГАТЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ ИЗ ЯДОВ МОРСКИХ АНЕМОН¹

© 2015 г. А. Н. Миков[#], С. А. Козлов

ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 31.03.2015 г. Принята к печати 22.04.2015 г.

В настоящий момент поиск новых лекарств на основе ядов животных (*venom-based drug discovery*) переживает второе рождение: фармкомпании постепенно осознают потенциал ядов животных как комбинаторных библиотек биологически-активных веществ. Морские анемоны – животные, которые производят наиболее разнообразные по структуре полипептидные компоненты яда, что отличает их от большинства других ядовитых животных. В обзоре рассмотрены известные полипептидные токсины из ядов морских анемонов, в первую очередь, с учетом их классификации по структурным признакам. Внутри каждого класса проанализированы наиболее яркие функциональные особенности этих полипептидов.

Ключевые слова: морские анемоны, полипептидные токсины, структурные мотивы.

DOI: 10.7868/S0132342315050085

ВВЕДЕНИЕ

Морские анемоны – малоподвижные хищники, которых, при обычном знакомстве с ними, можно воспринять скорее как украшения морского дна, нежели как опасных для нас существ. По своей сути, это представление о морских анемонах верно, поскольку, несмотря на то, что они относятся к ядовитым животным, лишь очень небольшое число видов этих стрекочущих может вызывать сильные ожоги. Будучи безопасными для человека, секреторируемые в клетках-нематоцистах полипептидные молекулы обладают огромным разнообразием, как структурным, так и в плане биологической активности.

Многие компоненты ядов актиний могут быть смертельными для рыб и ракообразных, что связано с наличием в них полипептидных блокаторов ионных каналов. Такие блокаторы в ходе длительной эволюции приобрели направленное действие только на те виды животных, которые включены в рацион питания морских анемонов. Первоочередная цель яда – это быстрое обездвиживание жертвы, так как догнать ее морская анемона никогда не сможет.

Защита от сухопутных хищников, в том числе от людей, не является приоритетом, и поэтому репертуар токсинов, специфически действующих на млекопитающих, в яде морских анемонов невелик, а их наличие является скорее следствием комбинаторной природы ядов.

Существует и вторая важная роль яда – наступательная. В битве за лучшее место под солнцем, в прямом смысле этого слова, морские анемоны пытаются занять наиболее удобный субстрат для прикрепления. Такие благоприятные для жизни места постоянно приходится захватывать/оборонять от других конкурентов-обитателей морского дна: кораллов, водорослей и прочих морских анемонов. В ходе такой борьбы за выживание используются не только токсины, но и сигнальные молекулы, как средства для внутри- и межвидовой коммуникации.

В итоге природный яд, синтезируемый в специальных стрекательных клетках-нематоцистах, содержит не столько токсины, сколько большое количество биологически активных полипептидов с самыми разнообразными функциями. Это, а так же безопасность морских анемонов для людей, привело к пристальному изучению их ядов и открытию в них большого количества полипептидных компонентов, перспективных для использования в качестве лекарственных средств и молекулярных инструментов исследования различных биологических мишеней [1–11]. Для многих полипептидов определена не только структура, но и биологическая функция. Именно эти компоненты наиболее подробно рассмотрены в данном обзоре.

¹ Статья публикуется по материалам сообщения, представленного на VII Российском симпозиуме “Белки и пептиды”; Новосибирск, 12–17 июля 2015 г.

Сокращения: ICK – Inhibitor Cystine Knot (ингибиторный цистиновый узел), SRDA – Single Residue Distribution Analysis (анализ распределения одиночных аминокислотных остатков), PDB – Protein Data Bank, pBLAST – protein Basic Local Alignment Search Tool.

[#] Автор для переписки (тел.: +7 (495) 336-65-40, e-mail: mikov.alexander@gmail.com).

КЛАССИФИКАЦИЯ ПОЛИПЕПТИДОВ

По разнообразию содержащихся в яде компонентов среди ядовитых животных сегодня лидируют пауки, отдельные представители которых могут продуцировать до ~170 индивидуальных компонентов различной природы, преимущественно полипептидов [12]. При этом в подавляющем большинстве случаев в пептидах используется лишь одна эволюционно устоявшаяся пространственная укладка, называемая структурным мотивом ингибиторного цистинового узла (inhibitor cystine knot, ИСК) [13, 14]. В сравнении с пауками, морские анемоны, возможно, не столь плодовиты в плане числа одновременно продуцируемых пептидных компонентов, однако, с точки зрения структурного разнообразия пространственной укладки полипептидов яда, их можно считать лидерами среди ядовитых животных. Так, структурно-функциональный анализ транскриптома средиземноморской анемоны *Anemonia viridis* показал 13 различных мотивов распределения остатков цистеина в полипептидных молекулах [15], что, в свою очередь подразумевает не менее 13 вариантов пространственной укладки полипептидной цепи.

Традиционно после обнаружения новых пептидов большинство исследователей присваивали им достаточно короткие названия, которые включали аббревиатуру видового названия изучаемого животного и какой-либо порядковый номер. В 2012 г. были анонсированы две разные номенклатуры, которые систематизировали название полипептидов морских анемон. Одна из них базировалась на рациональной номенклатуре (rational nomenclature), разработанной ранее для пептидных токсинов пауков [16]. В ней основной упор для группировки полипептидов делался на родовое имя изучаемого животного и трехбуквенную аббревиатуру видового названия, дополнительно предлагалось группировать полипептиды в соответствии с основной биологической активностью, например: актитоксины, актилизины, актифосфолипазы, актипротеазо-ингибиторы [17].

Вторая, “целесообразная номенклатура” (convenient nomenclature), предлагала различать цистеин-содержащие полипептиды морских анемон по структурным мотивам, в частности, по мотивам распределения цистеинов [18]. Одним из преимуществ структурных мотивов является то, что они изначально были разработаны для “анализа распределения одиночных аминокислотных остатков” (SRDA); в комбинации с этим методом они служат мощным инструментом поиска и предсказания закодированных в геномах полипептидов [19, 20]. Структурный подход позволяет группировать полипептиды по предполагаемым пространственным укладкам, и, в некоторой степени, учитывает не только размеры и наличие элементов вто-

ричной структуры, но и вероятную биологическую функцию.

На данный момент среди известных полипептидов морских анемон с точки зрения биологической функции охарактеризованы в основном токсины-блокаторы различных типов ионных каналов и ингибиторы протеиназ. Их активное изучение началось еще в 70–80-х годах XX века, когда были получены первые данные о полипептидах из морских анемон, воздействующих на Na^+ -каналы [21–24]. В дальнейшем для цистеин-содержащих и линейных полипептидов морских анемон было определено много различных биологических мишеней.

Обе имеющиеся на сегодня номенклатуры предполагают использование греческих букв в начале названия, если для полипептида известна конкретная биологическая мишень. Соответствие той или иной буквы определенному типу рецептора сложилось исторически, и, по возможности, остается неизменным для биологически активных пептидов из различных ядовитых животных (примеры соответствия приведены в номенклатуре [16]). Ранее опубликованные полипептиды пока не получили новых систематических названий, поэтому их наименование часто не отражает биологическую функцию.

СТРУКТУРНЫЕ МОТИВЫ

Как уже было отмечено, ранее было найдено 13 различных мотивов распределения остатков цистеина [15]. Однако прогресс в изучении компонентного состава ядов морских анемон привел к обнаружению новых полипептидов с необычным распределением остатков цистеина по длине молекулы. В связи с этим назрела необходимость в ревизии известных на сегодняшний день структурных данных. В таблице приведены все ранее описанные мотивы и четыре мотива, которые являются новыми для пептидов морских анемон. Перечисленные мотивы (включая 4 новых) можно обнаружить более чем в 400 последовательностях полипептидов, аннотированных в мировых банках данных. Многие аннотированные последовательности, однако, выведены из структур генов без доказательств их реального присутствия в природных ядах. Если рассматривать только подтвержденные первичные структуры, то следует принимать во внимание чуть более 100 неповторяющихся зрелых последовательностей цистеин-содержащих пептидов из морских анемон (по состоянию на начало 2015 г.) [25].

Важно подчеркнуть, что для отнесения полипептидных молекул к той или иной структурной группе важно не только совпадение структурного мотива, но и количество остатков цистеина в молекуле. Это количество также отражено в таблице для каждого мотива. Для формирования жесткой и

Структурные мотивы полипептидов из ядов морских анемонов. Жирным шрифтом выделены мотивы, впервые сформулированные в этой работе

Название мотива	Кол-во полипептидов ¹	Число Cys ²	Структура ³	Комментарии	Литература
1a	50	6	C1C##C6C-X ₁ -CC#	X ₁ = 6–9	[38–55]
1b	10	6	C1C##C9C-X ₁ -CC#	X ₁ = 6–8	[56–62]
2a	10	6	C8C-X ₁ -C*C3C2C	X ₁ = 4, 8; C-концевой Cys	[63–73]
2b	1	6	C6C#C*C3C#C	C-концевой Cys	[74]
2c	1	6	C1C#C*C3C##C	C-концевой Cys	[76]
2d	1	6	C3C#C*C6C##C	C-концевой Cys	[75, 76]
3a	14	6	C8C15C7C12C3C	–	[35, 71, 77–90]
4a	1	6	C8C5C10C1C8C#	–	[35]
5a	2	6, 8	CC1C-X ₁ -C5C4C#	X ₁ = 2, 4, 5	[91–97]
6a	1	8	C3C*C#C#C2C#C#C#	–	[98]
7a	1	6	C6C#C*C6C#C#	–	[98]
8a	2	10	C#CC#C*CC#C#C1C*C	C-концевой Cys	[106]
9a	5	4	C2C#C#C#	Комплексный предшественник	[35, 37, 99]
10a	1	2	C##C#	–	[100]
11a	2	6, 8	C6C#CC*C*C	Мотив ICK	[101]
11b	1	8	C6C#CC*C*C*C1C#	Мотив ICK	[101, 102]

¹ Учтены опубликованные в базе данных Uniprot последовательности с подтвержденной структурой.

² В зрелой последовательности.

³ Символы C – остатки цистеина, цифра между ними описывает число других аминокислотных остатков. Если расстояние между остатками цистеинов имеет дискретные значения на больших выборках, то оно приведено как величина X₁. Если эти расстояния сильно различаются, то используются символы подстановки: для указания расстояния: # – 1–9 а.о., ## – более 9 а.о., * – для сильно варьирующихся интервалов.

⁴ Несколько целевых гомологичных полипептидов синтезируется в составе общего белка предшественника.

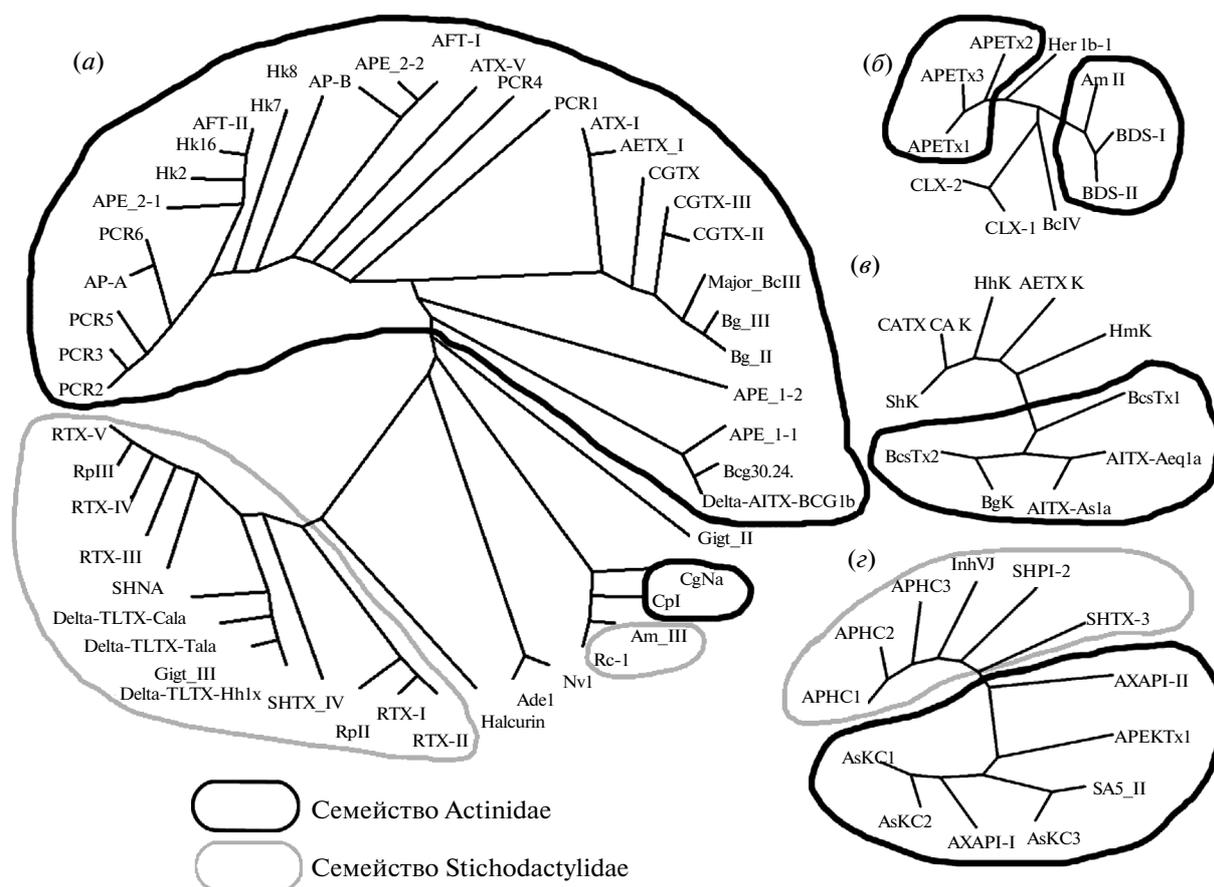
устойчивой к протеолизу структуры, полипептиды из ядов животных обычно имеют четное количество остатков цистеинов, каждый из которых вовлечен в образование одной из дисульфидных связей. Имеются данные о выведенных из транскриптомов вариантах полипептидов с нечетным количеством остатков цистеинов, но такие молекулы с доказанной биологической активностью пока не найдены. Наиболее вероятным объяснением наличия транскриптов с нечетным числом остатков цистеина является гипермутабельность генов, кодирующих активные полипептиды у ядовитых животных. Гипермутабельность не всегда приводит к образованию активных продуктов, зато позволяет получать конкурентные преимущества за счет молекулярного разнообразия компонентов яда [26–32].

Стоит отметить, что при рассмотрении белков-предшественников активных полипептидов морских анемонов количество остатков цистеинов в них может превышать указанные в таблице значения. Эти “лишние” остатки могут располагаться во фрагментах, отщепляемых при созревании полипептидов, – сигнальном пептиде или профрагменте. Наличие комплексных белков-предшественников,

которые кодируют по две или более независимых молекулы [33, 34], – это вторая распространенная причина большего количества цистеинов. Для мотива 9a наличие комплексного белка-предшественника является обязательным условием, так как все пока известные полипептиды этой группы синтезируются в виде комплексного белка-предшественника, содержащего не менее 4-х зрелых полипептидов [35–37].

ОСОБЕННОСТИ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ

Наиболее изучены и разнообразны полипептиды, стабилизированные тремя дисульфидными связями, при этом порядок их замыкания в разных мотивах различается. Именно с таких полипептидов структурных групп 1a, 1b, 2a и 3a хотелось бы начать более детальный обзор. Гомологию первичных структур правильно рассматривать только внутри каждой группы отдельно, при этом приводить сиквенсы всех полипептидов не рационально, так как все они известны и аннотированы в базе белковых последовательностей. На наш взгляд интересно рассмотреть только качественное родство, кото-



Филогенетическое дерево множественного выравнивания зрелых последовательностей полипептидов. Для построения деревьев проводили множественное выравнивание зрелых белковых последовательностей в программе Megalign (Dnastar Inc.), после чего визуализировали результаты сравнения в программе Dendroscope 3.2.10 [103]. *a* – результаты для группы 1a; *b* – для группы 1b; *c* – для группы 2a; *d* – для группы 3a.

рое можно оценить по филогенетическому анализу (рисунок).

На филогенетической диаграмме токсины группируются не по близости биологических свойств, а по видовому родству морских анемонов, из которых они были выделены. Наибольшее количество полипептидов выделено из морских анемонов семейства Actiniidae – это виды *Anthopleura xanthogrammica*, *Condylactis gigantea*, *Bunodosoma granuliferum*, *B. caesarum*, *B. cangicum*, *Anemonia sulcata*, *Anthopleura elegantissima*, *Anth.a* sp. ‘Zhanjiang’, *C. gigantea plassiflora*, *Anth.a fuscoviridis*, *A. erythraea*. Во всех четырех проанализированных группах (панели *a–d*, рисунок) большинство полипептидов из морских анемонов семейства Actiniidae располагаются в одной области и не пересекаются с остальными токсинами, за исключением пары CgNa, CpI в группе 1a и членов группы 1b. Второе наиболее изученное семейство морских анемонов Stichodactyliidae (*Stichodactyla helianthus*, *Thalassianthus aster*, *Cryptodendrum adhaesivum*, *Heterodactyla hemprichii*, *S. gigantea*, *Antheopsis maculata*, *S. haddoni*, *Radianthus paumotensis*, *Heteractis crispa*), представители которого расположились в

группах 1a и 3a также совместно, за исключением пептидов Rc-1 из *H. crispa* и Am-III из *Antheopsis maculata* в группе 1a. Это означает, что гомологическое родство токсинов внутри одной структурной группы может находиться под влиянием эволюции самих животных. Похожие животные с большей вероятностью производят похожие токсины. Для мало представленных групп нет смысла проводить анализ гомологии первичной структуры, так как выборка небольшая.

ПОЛИПЕПТИДЫ ГРУППЫ 1a

К первой группе принадлежат хорошо изученные полипептиды, продуцируемые морскими анемонами (~50% охарактеризованных токсинов). Это может быть связано как с тем, что эти пептиды действительно очень широко представлены в ядах морских анемонов, так и с тем, что охарактеризовать их по биологической активности можно проще, чем остальные. Все полипептиды группы 1a были охарактеризованы (или предсказаны по гомологии с уже изученными) как ингибиторы/блокаторы по-

тенциал-зависимых Na^+ -каналов, способные связываться с сайтом 3 и ингибировать процесс инактивации этих трансмембранных белков [43–55].

Структурные особенности

Полипептиды имеют длину от 44 до 49 а.о., среди которых всегда 6 остатков Cys, образующих три дисульфидные связи. Аналогично, молекулы токсинов из ядов пауков тоже преимущественно шести-цистеиновые (так называемый ИСК-фолд). Вполне возможно, что для полипептидных токсинов указанного размера наличие трех дисульфидных связей является, с точки зрения термодинамики, оптимальной комбинацией, позволяющей создавать устойчивые биомолекулы. Однако есть работы, показывающие, что тот же ИСК-фолд отвечает за термическую устойчивость, а не за термодинамическую стабильность [104].

На данный момент пространственные структуры определены для сравнительно небольшого (в процентном отношении) количества токсинов, а именно для (здесь и далее, в скобках после названия идет идентификатор структуры токсина в базе PDB): AP-A (1SH1), AP-B (1AHL), ATX-I (1APF), CgNa (1ATX), SHNA (2H9X). В целом, пространственные структуры этих токсинов очень схожи между собой и представляют собой ядро, включающее в себя скрученный четырехтяжевый антипараллельный β -лист, соединенный тремя петлями [38–42]. Также в ряде структур определены явно выраженные β -повороты типа I (AP-A, SHNA) [38, 42]. Ядро стабилизировано тремя дисульфидными связями, часть из которых подвергается *цис-транс*-изомеризации в растворе, что увеличивает конформационную свободу белков [38–42].

Биологическая активность

Единственным типом активности, определенным для токсинов семейства 1a на данный момент, является ингибирование инактивации потенциал-активируемых Na^+ -каналов (ингибиторы δ -типа). Для значительной части молекул группы активность не определена экспериментально, а лишь предсказана по гомологии с другими токсинами группы. Экспериментально, с различной степенью достоверности и детальности, вид действия определен для следующих токсинов: PCR1, PCR4, PCR5, PCR6, CGTX, CDTX-II, CGTX-III, RTX-I, RTX-II, RTX-III, RTX-IV, RTX-V, AP-A, AP-B, AFT-I, AFT-II, ATX-I, ATX-V, δ -AITX-Vcg1a, δ -AITX-Vcg1b, APE_1-1, Major_VcIII, Vcg30.24, Bg_II, Bg_III, CgNa, Am_III, Halcurin, RpII, RpIII, SHNA [43–55]. Разные токсины различаются в деталях по типу действия весьма значительно – как с точки зрения специфичности по клеткам, подтипам каналов, так и по ингибируемым компонентам токов.

Иногда обнаруживалась и исследовалась сразу целая группа токсинов. Например, токсин PCR1 из морской анемоны *Anthopleura xanthogrammica*, по всей видимости являющийся ингибитором инактивации Na^+ -каналов, усиливал вератридин-зависимые Na^+ -токи в клетках мозга линий RT4-B (крыс) и N1E-115 (мышей) [43]. PCR4 на тех же системах действовал аналогичным образом с кинетической константой достижения полу-максимальных Na^+ -токов $K_{0.5} 329 \pm 34$ и 1354 ± 125 нМ соответственно, PCR5 оказался неактивен, а PCR6 в тех же системах имел $K_{0.5} 47 \pm 5$ и 108 ± 11 нМ соответственно [43].

Из морской анемоны *B. cangicum* было получено несколько кангитоксинов [44–46]. CGTX способен был при введении вызывать эпилептогенические судороги у крыс и мышей [44], но подробнее мишень действия не устанавливалась. CGTX-II отличается от CGTX одним аминокислотным остатком, он ингибировал Na^+ -каналы подтипов SCN1A/ $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.5/\text{SCN5A}$ и $\text{Na}_v1.6/\text{SCN8A}$ (экспрессированных в HEK-293) [45, 46]; действие токсина выражалось в пролонгировании инактивации и увеличении амплитуды медленной компоненты тока [45, 46]. При концентрации 1.9 мкМ активно возрастала доля медленной компоненты тока Na^+ -каналов подтипов SCN1A/ $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.5/\text{SCN5A}$ и $\text{Na}_v1.6/\text{SCN8A}$, однако при 50 нМ сильнее всего эффект был на подтипах $\text{Na}_v1.5/\text{SCN5A}$ и $\text{Na}_v1.6/\text{SCN8A}$ [45, 46]. CGTX-III – минорный компонент яда, отличающийся от CGTX-II также лишь одной аминокислотой, – селективно ингибировал инактивацию Na^+ -каналов подтипа SCN1A/ $\text{Na}_v1.1$, экспрессированных в HEK-293 [48].

Из анемоны *H. crista* было выделено несколько гомологичных токсинов: RTX-I, RTX-II, RTX-III, RTX-IV, RTX-V, среди которых подробно изучен был только токсин RTX-III [47, 48]. Этот токсин взаимодействует с Na_v -каналами (подробнее подтип/подтипы не установлены), ингибирует их инактивацию и замедляет фазу реполяризации потенциала действия мышечных и нервных волокон [47]. RTX-III взаимодействует с каналом, по всей видимости, по “многоточечному” механизму [48].

Много работ было связано с изучением влияния токсинов этой группы на сердечную деятельность. Пара пептидов AP-A и AP-B изначально обнаружены как пептиды, способные стимулировать сердечную активность млекопитающих. AP-B является самым сильным стимулятором сердечной активности из всех токсинов анемонов [49], AP-B усиливал вератридин-зависимый тетродотоксин-чувствительный транспорт катионов $^{22}\text{Na}^+$ в клетках N18 с кинетической константой достижения полу-максимальных Na^+ -токов $K_{0.5} 22 \pm 7$ и 32 ± 12 нМ (данные для рекомбинантного аналога и природного

пептида) [50]. Такой же эффект отмечен на клеточных линиях N1E-115 и RT4-B, которые экспрессируют миокардические формы Na^+ -каналов [50].

Для токсина АТХ-V этой группы установлено, что в коронарных миоцитах человека он модулирует прохождение особых тетродотоксин-чувствительных Na^+ -токов, которые имеют как медленную, так и быструю компоненты спада [51]. Токсин Vg II ингибирует инактивацию Na^+ -токов в кардиомиоцитах крыс, а также инактивацию кардиомиоцитарных Na^+ -каналов hH1 с EC_{50} 58 и 0.38 мкМ, соответственно [52]. Токсин Vg III обладает аналогичным действием на те же объекты с EC_{50} 78 и 0.78 мкМ соответственно [52].

Среди токсинов с установленным действием на подтипы Na^+ -каналов следует еще отметить токсины АФТ-II и АТХ-II. АФТ-II ингибирует каналы подтипов $\text{Na}_v1.4$, $\text{Na}_v1.5$, $\text{Na}_v1.6$ с EC_{50} 30, 62, 240 нМ; АТХ-II ингибировавал $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.5$, $\text{Na}_v1.6$ с EC_{50} 7, 7, 55, 240 нМ соответственно [53]. Major VcIII, в клетках линии НЕК-293, экспрессирующих Na^+ -каналы различных типов, вызывал инактивацию каналов подтипов: $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.6$ с примерно одинаковой EC_{50} 300 нМ [53]. Vcg30.24 ингибировавал Na^+ -каналы различных типов в клетках линии НЕК-293: $\text{Na}_v1.5$, $\text{Na}_v1.6$, $\text{Na}_v1.1$ с EC_{50} 440 ± 32 , 1740 ± 351 , 453 ± 31 нМ соответственно [54]. CgNa ингибировавал с разной селективностью Na^+ -каналы подтипов: $\text{rNa}1.3/\beta1$, $\text{mNa}1.6/\beta1$, $\text{hNa}1.5/\beta1$, $\text{DmNa}_v1/\text{tipE}$ с EC_{50} 661.7 ± 167.6 , 248.8 ± 65.9 , 3060.5 ± 1127.6 , 187.4 ± 34.9 нМ соответственно [55].

ПОЛИПЕПТИДЫ ГРУППЫ 1b

Структурная группа 1b в настоящее время содержит всего 10 полипептидных токсинов, для 8 из которых экспериментально доказана биологическая активность. Биологическими мишенями этих токсинов, в отличие от представителей группы 1a, являются разные клеточные рецепторы [59, 60].

Структурные особенности

Токсины длиной 41–46 а.о. стабилизированы тремя дисульфидными связями, которые замыкаются по схеме: C1–C5, C2–C4, C3–C6. Все токсины группы 1b аннотируются (Pfam) как имеющие дефензин-подобную укладку. Пространственная структура была определена для трех представителей группы 1b: АРЕТх1, АРЕТх2, BDS-I [56–58]. Структура АРЕТх1, полученная методом ЯМР в растворе (PDB: 1WQK), может быть охарактеризована как комбинация компактного дисульфид-стабилизированного ядра, состоящего из четырехтяжевого β -листа и выходящих из этого ядра N- и C-конце-

вых участков [56]. Как АРЕТх2 (1WXN) [57], так и токсин BDS-I (1BDS, 2BDS) [58] имеют практически одинаковое пространственное устройство с АРЕТх1. Однако эти три токсина обладают различной биологической активностью, что связано с различиями в аминокислотных остатках, формирующих поверхностные участки их молекул.

Биологические мишени

Наиболее детально изученный представитель группы 1b – АРЕТх1, специфически блокирует так называемые hERG (human ether-a-go-go-related gene) K^+ -каналы человека, которые обнаружены в клетках как центральной нервной системы, так и сердца [59]. В трансфецированных COS M6 клетках АРЕТх1 подавляет амплитуду hERG-токов с IC_{50} 34 нМ, действие происходит быстро, обратимо и потенциал-зависимо [59]. Слабое действие наблюдалось также на каналах подтипа $\text{K}_v1.4$ ($27 \pm 10\%$). Позднее было показано, что токсин действует на изоформы каналов hERG1 и hERG3, в то время как форма hERG2 к нему невосприимчива [60]. Гомолог АРЕТх1 – токсин АРЕТх3, отличается от него всего одной заменой (Thr3/Pro). Однако это минимальное различие приводит к тому, что АРЕТх3 не действует на hERG, но ингибирует инактивацию Na^+ -каналов млекопитающих и насекомых (EC_{50} 276 нМ) [60].

Два токсина BDS-I и BDS-II являются первыми найденными ингибиторами быстро инактивирующихся K^+ -каналов $\text{K}_v3.4$ с IC_{50} 47 и 56 нМ соответственно [61]. Действие токсинов на $\text{K}_v3.4$ -токи в трансфецированных клетках COS M6 обратимо [61]. BDS-I и BDS-II являются селективными токсинами, они не действуют на K^+ -каналы внутреннего выпрямления, оказывают слабое воздействие на тетродотоксин-чувствительные Na^+ -каналы в клетках нейробластомы, не воздействуют на Na^+ -каналы кардиомиоцитов и клеток скелетных мышц [61].

Мишенью действия для токсинов этой группы является также протончувствительные каналы ASIC3, главные сенсоры pH в сенсорных нейронах периферической нервной системы, имеющие сложный ответ, состоящий из быстрой и медленной компонент токов [62]. АРЕТх2 ингибирует токи через каналы ASIC3 крыс, экспрессированные в ооцитах (IC_{50} 63 нМ), ингибирует каналы ASIC3 человека, экспрессированные в клетках COS-7 (IC_{50} 175 нМ), а так же гетеромерные ASIC2b-ASIC3-каналы (IC_{50} 117 нМ) и с меньшей активностью – гетеромерные ASIC1b-ASIC3- (IC_{50} 0.9 мкМ) и ASIC1a-ASIC3-каналы (IC_{50} 2.0 мкМ) [4]. Кроме этого, АРЕТх2 ингибирует активацию Na^+ -каналов, экспрессированных в ооцитах $\text{Na}_v1.2$ и $\text{Na}_v1.8$, с параметрами EC_{50} , 92 ± 4 и 55 ± 10 нМ соответственно [60]. Другой представитель группы – это токсин Hcg

Ib-1, который подавлял амплитуду быстрой составляющей токов на экспрессированных в ооцитах каналах hASIC3 с $IC_{50} 5.5 \pm 1.1$ мкМ [60].

ПОЛИПЕПТИДЫ ГРУППЫ 2a

В этой группе на данный момент находятся исключительно ингибиторы потенциал-чувствительных K^+ -каналов. В основном биологическая активность токсинов была доказана на каналах задержанного выпрямления и Shaker-подобных семейств. Это довольно короткие полипептиды, не превышающие по длине 40 а.о. При аннотации эти токсины классифицируются как содержащие ShKT-домен, по имени токсина ShK – первого и наиболее исследованного представителя этой группы [68–73].

Пространственная структура

Пространственные структуры экспериментально были установлены только для двух представителей данной группы: для ShK и BgK. Пространственная структура токсина ShK разрешена при помощи метода ЯМР в растворе [63], а также рентгеноструктурного анализа кристалла [64]. При получении кристалла методом нативного химического лигирования по связи Gln-Cys синтезировали рацемическую смесь токсинов *L*-ShK и *D*-ShK, где *L*-форма оказалась в 50000 раз более активной [64]. Метод рацемической белковой кристаллографии позволил получить структуру рацемического ShK-токсина с разрешением 0.97 Å (PDB: 4LFS); структура же *L*-ShK получена с разрешением 1.06 Å (PDB: 4LFQ) [64]. Помимо этого, методом ЯМР были определены пространственные структуры немодифицированного ShK (1ROO) [63], токсина с заменой Lys22 на диаминопропионовую кислоту ([Dap²²]-ShK, 1BE1) [65] и искусственного токсина ShK-192 (2K9E) [66]. Природной формой является ShK, поэтому подробное описание структуры приведено именно для него. Остальные перечисленные формы имеют лишь незначительные структурные отличия.

Основными элементами вторичной структуры немодифицированного ShK являются две расположенные рядом короткие α -спирали, захватывающие участки 14–19 и 21–24. В *N*-концевой области формируется пара β -поворотов, первый из которых является неклассическим, второй – поворотом типа I; еще один β -поворот типа I расположен ближе к *C*-концевой области. Цистеины замыкаются по схеме CI–CVI, CII–CIV, CIII–CV. А связь CI–CVI, предположительно, играет важную роль в создании плотно упакованной молекулы, как бы замыкая молекулу в кольцо. Остальные связи – CII–CIV, CIII–CV, отвечают за стабилизацию структуры, они связывают участки α -спиралей с *C*-концевыми аминокислотами [63].

Токсин BgK по пространственной структуре похож на ShK [67].

Биологические мишени

Токсины группы 2a избирательно действуют на потенциал-активируемые K^+ -каналы. Для некоторых ингибиторов подтип мишени остается неопределенным, некоторые взаимодействуют с K^+ -каналами нескольких подтипов. Пока известен только один токсин HmK, действующий избирательно на каналы $K_v1.2$ -подтипа, относится к высокоселективным ингибиторам. Он конкурирует за связывание α -[¹²⁵I]дендротоксина с синаптосомальными мембранами из мозга крыс с $K_i \sim 1$ нМ ($IC_{50} 3.2$ нМ) [68]; и блокирует K^+ -токи через каналы $K_v1.2$, экспрессированные в клеточных линиях млекопитающих (10 нМ HmK вызывал падение амплитуды $K_v1.2$ -токов на 60%, значение IC_{50} не устанавливалось) [68]. Иногда биологическая мишень бывает не установлена. Так, для AETX K и AITX-Aeq1a показано только, что оба полипептида ингибируют связывание α -[¹²⁵I]дендротоксина с синаптосомальными мембранами из мозга крыс с $IC_{50} 91$ и 22 нМ соответственно [69, 70]. Другой токсин AITX-As1a ингибирует связывание α -[¹²⁵I]дендротоксина I с микросомами мозга крыс с $IC_{50} 27$ нМ [71].

Обычно для токсинов этой группы характерна широкая специфичность к различным подтипам K^+ -каналов. BgK ингибирует потенциал-активируемые K^+ -каналы Shaker-типа и не ингибирует $K_v3.1$ -каналы (K_v Shaw-типа). Интересно, что активность амидированной формы (BgK-NH₂) немного отличается от активности природного (BgK-OH) токсина. По отношению к нескольким типам Shaker-подобных K^+ -каналов, значения IC_{50} (в нМ) составило для BgK-OH: $K_v1.1$ – 6, $K_v1.2$ – 15, $K_v1.3$ – 10; для BgK-NH₂: $K_v1.1$ – 9, $K_v1.2$ – 13, $K_v1.3$ – 14 [72]. Таким образом, даже незначительная разница в структуре изменяет сродство пептида к каналам $K_v1.1$ -подтипа.

VcsTx1 хорошо ингибирует потенциал-зависимые K^+ -Shaker-каналы подтипа $K_v1.2$ ($IC_{50} 0.03 \pm 0.006$ нМ) и других подтипов, а именно: $K_v1.1$ ($IC_{50} 405.0 \pm 20.56$ нМ), $K_v1.3$ ($IC_{50} 74.11 \pm 20.24$ нМ), $K_v1.6$ ($IC_{50} 1.31 \pm 0.20$ нМ) и канал обратного выпрямления насекомых ($IC_{50} 274.69 \pm 95.97$ нМ) [73]. Токсин VcsTx2 лучше всего ингибирует каналы подтипа $K_v1.6$ ($IC_{50} 7.76 \pm 1.90$ нМ), а также подтипов $K_v1.1$ ($IC_{50} 14.42 \pm 2.61$ нМ), $K_v1.2$ ($IC_{50} 80.40 \pm 1.44$ нМ), $K_v1.3$ ($IC_{50} 13.12 \pm 3.29$ нМ), кроме того действует на канал обратного выпрямления насекомых ($IC_{50} 49.14 \pm 3.44$ нМ) [73]. Было определено, что немодифицированный ShK ингибирует каналы $mK_v1.3$ с $K_d 11.0 \pm 1.4$ пМ (примерно одинаковые значения получены для экспрессирован-

ных в ооцитах *Xenopus* и в клетках базофильного лейкоза крыс L929-каналах) [68] и $K_v1.3$ Т-клеток крови с похожим родством (данные не были указаны [65]; иммуносупрессирующее действие). Помимо этого, ShK конкурирует с [^{125}I]ChTX за связывание с $hK_v1.3$ на мембранах с IC_{50} 118 ± 20 пМ [65]. Однако ShK, помимо этого, блокирует сердечную и нейрональную формы каналов $mK_v1.1$ (показано на ооцитах и на L929), $mK_v1.4$ и $gK_v1.6$ (показано только на ооцитах), концентрации IC_{50} составили 16 ± 3 , 312 ± 51 и 165 ± 3 пМ, соответственно [65].

ПОЛИПЕПТИДЫ ГРУППЫ 3a

Группа 3a представлена 14-ю 6-цистеиновыми полипептидами с распределением Cys-остатков по мотиву C8C15C7C12C3C (мотив Кунитца). С точки зрения активности, в группе представлены ингибиторы протеиназ, ингибиторы потенциал-активируемых K^+ -каналов с “задержанным выпрямлением”, K^+ -каналов Shaker-типа, ингибиторы ваниллоидных рецепторов TRPV1. Возможно, в будущем будут открыты другие молекулы этой группы, селективные к иным биологическим мишеням. Все молекулы семейства в той или иной степени могут ингибировать протеиназы. В наименьшей степени это относится к ингибиторам ваниллоидных рецепторов.

Структурные особенности

Полипептиды группы 3a длиной от 54 до 63 а.о. гомологичны между собой в пределах 84–91% и сходны по первичной структуре с различными ингибиторами протеиназ. Например, AXPI-I гомологичен ингибитору протеиназ тайкатоксину TCX (идентичность 69%, pBLAST) из одной из самых ядовитых змей мира – прибрежного тайпана *Oxyuranus scutellatus scutellatus*. Некоторые представители группы гомологичны как ингибиторам протеиназ, так и ингибиторам K_v -каналов (например, каликлудины AsKC1, AsKC2, AsKC3 имеют значительную гомологию как с дендротоксином DTXI, так и с BPTI).

Пространственная структура не установлена для подавляющего большинства полипептидов группы 3a, однако по первичной структуре все они аннотируются как имеющие укладку BPTI/Kunitz (Pfam, PROSITE, InterPro). Укладка включает в себя короткую 3_{10} -спираль на N-конце, β -шпильку, между тяжами которой располагается β -поворот в середине, и α -спираль на C-конце.

Единственный токсин с установленной пространственной структурой – SHPI-I. Структура установлена как методом ЯМР в растворе (1SHP) [77], так и методом рентгеноструктурного анализа кристалла рекомбинантного аналога токсина г-ShPI-1A (3OFW) с разрешением 2.5 \AA [78]. Уста-

новлены структуры комплексов этого токсина с различными молекулами-мишенями, на которые он действует: комплекс [^{13}Leu]мутанта ShPI-1 с панкреатической эластазой из кабана *Sus scrofa* с разрешением 2.0 \AA (3UOU, данные депонированы в базу данных PDB, но соответствующая статья еще не принята в печать); комплекс рекомбинантного токсина с бычьим панкреатическим трипсином (3M7Q) с разрешением 1.7 \AA [79]; комплекс рекомбинантного токсина с бычьим химотрипсином (3T62, данные депонированы в базу данных PDB, но соответствующая статья еще не принята в печать) с разрешением 2.0 \AA . Такой интерес к токсину ShPI-1 можно объяснить его широкой ингибирующей активностью в отношении большого количества протеиназ.

Пространственная структура SHPI-I, установленная методом ЯМР в растворе [77], практически полностью идентична пространственной структуре BPTI, несмотря на сходство всего в 35% по первичной структуре между ними (pBLAST). Нет оснований полагать, что другие молекулы токсинов данного структурного семейства имеют принципиально другое пространственное строение – различия могут быть только в деталях.

Биологическая активность

Ингибиторами/блокаторами потенциал-активируемых K^+ -каналов в группе 3a являются пять полипептидов: APEKTx1, AsKC1, AsKC2, AsKC3, SHTX-3. Они блокируют K^+ -каналы Shaker-типа различных подтипов: APEKTx1 – $K_v1.1$ (KCNA1) [80], AsKC1-3 – $K_v1.2$ (KCNA2) [71]. Активность SHTX-3 не определена с точностью до подтипа ингибируемого канала/тока. SHTX-3 ингибирует связывание α -[^{125}I]дендротоксина с синаптосомальными мембранами крыс с IC_{50} примерно 650 нМ [35]. Активность APEKTx1 против подтипа $K_v1.1$ (IC_{50} 0.9 ± 0.1 нМ) потенциал-независима и сопоставима с таковой для дендротоксинов DTXI (IC_{50} 2.1 нМ) и α -DTX (IC_{50} 0.4 нМ) [80]. APEKTx1, скорее всего, является поровым блокатором, поскольку его эффект не зависит от потенциала мембраны. Каликлудины (AsKC1-3) ингибируют потенциал-зависимые K^+ -каналы $K_v1.2$, экспрессированные в ооцитах *Xenopus*. Способностью к ингибированию каналов $K_v1.2$ отличаются (в скобках IC_{50} , нМ): AsKC2 (1100) > AsKC3 (1300) > AsKC3 (2800) [71].

Каликлудины (AsKC1–AsKC3) проявляют свойства ингибиторов протеиназ. Для всех трех молекул характерна одинаковая активность в отношении трипсина (K_d 30 нМ) [71]. APEKTx1 ингибирует трипсин с K_d 124 нМ [80]; 3-х кратный избыток APEKTx1 относительно трипсина полностью блокирует действие последнего (это втрое больше, чем

необходимое количество бычьего панкреатического ингибитора трипсина, BPTI) [80].

Полипептид из морской анемоны *Anth.a aff. xanthogrammica* AXPI-I ингибирует трипсин (1900 МЕ/мг), и имеет слабую активность относительно химотрипсина, эластазы, а так же металлопротеиназы термолизина [81, 82]. Второй полипептид AXPI-II специфически ингибирует химотрипсин и слабо ингибирует α -химотрипсин [81]. Для полипептида SA5_II была обнаружена важная особенность по ингибированию широкого спектра калликреинов из тканей и из плазмы крови [83]. Калликреины – это сериновые протеиназы, которые помогают организму координировать многие физиологические процессы, такие как изменение давления крови и шелушение кожи [84], и даже являются биомаркерами рака у людей [85]. Ингибитор InhVJ из яда *Radianthus macrodactylus* высокоспецифичен по отношению к трипсину (K_i 2.49 нМ), α -химотрипсину (K_i 27.1 нМ), но не действует на тромбин, калликреин и папаин [86].

Среди всех ингибиторов протеиназ следует выделить ShPI-1, который является неспецифическим ингибитором, с уникальной широкой специфичностью к протеиназам различных типов: сериновым, цистеиновым и аспарагиновым [87]. Константы ингибирования ShPI-1 в отношении различных протеиназ составили (K_i , нМ): для бычьего трипсина – 1.1, человеческого плазмина – 2.7, химотрипсина – 2.3, свиного калликреина – 85.0, свиного пепсина – 33.0 [87]. Такая широкая специфичность позволяет использовать ShPI-1 как иммобилизованный лиганд, с помощью которого можно выделять фракции, богатые протеиназами [87].

Ингибиторами ваниллоидных рецепторов среди компонентов, полученных из морских анемонов, являются лишь три токсина из группы 3a: APHC1 [88], APHC2 и APHC3 [89]. Все три токсина действуют на неселективные к катионам каналы TRPV1, которые активируются несколькими основными способами: температурой, низкими значениями pH и капсаицином [105]. APHC1 и APHC3 действуют как частичные антагонисты капсаицин-вызванных TRPV1-токов [88, 89]. APHC1 ингибирует эти токи на $32 \pm 9\%$ с ED_{50} 54 ± 4 нМ [88]. APHC1 не действует на TRPV1-токи, вызванные низкими значениями pH [88]. APHC3 ингибирует капсаицин-вызванные токи на 25% (300 нМ), а токи, вызванные низкими значениями pH – на 80% (240 нМ) [89]. Анальгетический эффект APHC1 и APHC3 показан в различных тестах *in vivo* на мышах, где APHC1/APHC3 в дозах порядка 0.01–0.1 мг/кг оказывают существенный анальгетический эффект, не вызывая при этом гипертермии, как это бывает со многими антагонистами TRPV1 [90].

ПОЛИПЕПТИДЫ ИЗ МАЛО ПРЕДСТАВЛЕННЫХ ГРУПП

К мало представленным относятся все остальные группы, которые пока включают не более 5 полипептидов. Это не означает низкую представленность этих компонентов в составе природных ядов морских анемонов, а свидетельствует только о пока слабом интересе к ним со стороны исследователей.

Группы 2b, 2c, 2d состоят из одного полипептида каждая. Для них характерна общая черта, как и у мотива 2a – C-концевой аминокислотный остаток цистеина. Метридин из группы 2b, проявляющий гемолитическую активность, был выделен из яда *Metridium senile* (Metridiidae) [74]. Пространственная структура не устанавливалась, но он аннотируется как ShKT-доменсодержащий токсин (InterPro, PROSITE). Группа 2d состоит из ингибитора эластазы AEI из анемоны *A. sulcata*. Это полипептид длиной 48 а.о., с шестью цистеинами, которые образуют три дисульфидные связи по классическому для ингибиторов эластаз Kazal-типа мотиву [75]: CI–CV, CII–CIV, CIII–CVI. Пространственная структура этого токсина (1Y1B) представляет собой комбинацию центральной α -спирали и трехтяжевого антипараллельного β -листа, как и в эластазах Kazal-типа; однако, в отличие от них CysI и CysIV, образующие мостик, сдвинуты ближе к C-концу [76]. Химически синтезированный аналог ингибитора эластазы AEI-аналог (AEIA) образует группу 2c. При идентичности в 92% аналог содержит цистин-стабилизированный α -спиральный мотив (CSH), что подтверждается данными пространственной структуры (1Y1C_A) [76]. За счет наличия CSH-мотива AEIA имеет более узкую специфичность по сравнению с AEI. AEI действует как на протеиназу B из *Streptomyces griseus* (K_i 1.7×10^{-11} М), так и на свиную панкреатическую эластазу (K_i 3.6×10^{-12} М). AEIA активен лишь по отношению к протеиназе B из *Streptomyces griseus* (K_i 7.0×10^{-11} М) [76].

Для SHTX-5 из группы 4a экспериментально не установлена биологическая активность, но, если судить по близкой гомологии с EGF, вероятно, он может проявлять EGF-подобную активность (EGF – эпидермальный фактор роста, epidermal growth factor). Необычный белок-предшественник содержит 9 остатков цистеина [35].

В группу 5a входят два токсина-гомолога – ATX-III и PA-TX, выделенные из морских анемонов *A. sulcata* и *Entactmaea quadricolor* [91, 92]. Эти полипептиды имеют разную длину (27 и 31 а.о.), и количество остатков цистеина (6 и 8). В ATX-III остатки цистеина замыкаются по мотиву CI–CV, CII–CIV, CIII–CVI; порядок замыкания в PA-TX экспериментально не установлен. Пространственная структура определялась только для ATX-III. Структура этого токсина (1ANS) представляет со-

бой компактный фолд, состоящий из 4 обратных поворотов (искаженный β -поворот I типа в остатках 6–9, β -поворот I типа во фрагментах 8–11 и инвертированные γ -повороты во фрагментах 12–14 и 15–17) и двух других поворотов цепи [93]. АТХ-III и РА-ТХ являются ингибиторами инактивации потенциал-активируемых Na^+ -каналов. АТХ-III конкурирует за связывание с нейрональными мембранами насекомых с классическим ингибитором инактивации натриевых каналов токсином скорпиона *Leiurus quinquestriatus hebraeus* Lqh α IT (K_i 21.4 \pm 7.1 нМ) [94], а также ингибирует инактивацию DmNa_v1 -каналов *Drosophila melanogaster* (полная инактивация при действии 1 мкМ токсина), но не действует на Na_v5 -каналы млекопитающих, экспрессированные в ооцитах *Xenopus* [94]. Интересно отметить, что для АТХ-III установлена токсичность к ракообразным, но не к млекопитающим [95, 96]. Для токсина РА-ТХ установлены аминокислотные остатки, необходимые для токсического действия на крабов [97].

Группа 6а представлена восьми-цистеиновым, токсичным для крабов акрорхагином-1 длиной 50 а.о., с неопределенной схемой замыкания дисульфидных связей [98]. Сходный акрорхагин-2 из группы 7а (также токсичный для крабов) содержит уже шесть цистеинов и имеет длину 44 а.о., с замыканием дисульфидов по схеме CI–CII, CIII–CIV, CV–CVI [98].

В группе 8а содержатся два полипептидных токсина, АЕТХ II и АЕТХ III длиной 59 а.о., с 10 остатками цистеина, причем один из них является С-концевым. Пока данных по структурным особенностям и биологической активности для них нет [106].

Токсины: Ugr 9а-1, Am-1, SHTX-1/SHTX-2, U-SHTX-Sdd1, длиной 29, 27, 28, 28 и 29 а.о. соответственно, входят в группу 9а и имеют по 4 цистеина. Для SHTX-1 и SHTX-2, которые отличаются только в одном остатке в положении 6, первый N-концевой остаток не расшифрован окончательно. Замыкание дисульфидных связей подчиняется паттерну CI–CIII, CII–CIV; Am-1, SHTX-1 и SHTX-2 содержат необычный аминокислотный остаток 4-гидроксипролина [35], U-SHTX-Sdd1 содержит гликозилированный остаток в 1-ом положении [37]. Пространственная организация изучена на примере токсина Ugr 9а-1 (2LZO). Молекула Ugr 9а-1 содержит три классических β -поворота и скрученную β -шпильку, причем последняя не стабилизирована межтяжевыми дисульфидными связями [99]. Биологические мишени у представителей группы неоднородны. Ugr 9а-1 обратимо ингибирует как быстрые, так и медленные токи через канал ASIC3, что было показано на человеческих hASIC3, экспрессированных в ооцитах *Xenopus* (IC_{50} 10 \pm 0.6 мкМ для полного ингибирования быстрой компоненты, и ингибирование медленной компоненты 48 \pm

\pm 2% с IC_{50} 1.44 \pm 0.19 мкМ) [99]. SHTX-2 конкурирует с α -[^{125}I]дендротоксином за связывание с синаптосомальными мембранами крыс с IC_{50} 270 нМ, следовательно, является ингибитором потенциалзависимых K^+ -каналов [35].

Единственным представителем группы 10а является двух-цистеиновый токсин Vcg III 21.75 длиной всего 30 а.о., с неустановленной биологической активностью. Он был идентифицирован протеомными методами в яде морской анемоны *Bunodosoma cangicum* [100].

Совершенно недавно в яде морских анемонов были обнаружены полипептиды, имеющие мотив ингибиторного цистинового узла (ICK), наиболее характерного для токсинов из яда пауков [101]. У представителей группы 11а классический шестицистеиновый ICK-мотив (π -PMTX-Pcr1a, длина 32 а.о.), либо два дополнительных остатка цистеина добавлены в N-концевой области пептида (токсин VcsTx3, длина 50 а.о., 8 цистеинов). К группе 11b принадлежит токсин MsePTx1 (длина 49 а.о., 8 цистеинов). Экспериментально ни для одного из этих токсинов порядок замыкания дисульфидных мостов не устанавливался, однако велика вероятность замыкания по характерному ICK-мотиву: CI–CIV, CII–CV, CIII–CVI. Токсины ингибируют ASIC- и K_v -каналы. Так, π -PMTX-Pcr1a обратимо ингибирует протон-чувствительные каналы в нейронах спинальных ганглий крыс (IC_{50} 100 нМ), а также обратимо ингибирует калиевые токи в нейронах спинальных ганглий крыс (IC_{50} 3.5 мкМ) [101]. Токсин VcsTx3 ингибирует с разной активностью целый ряд подтипов калиевых каналов, экспрессированных в *Xenopus* (в скобках указано IC_{50} , нМ): $\text{K}_v1.2$ (172.59), $\text{K}_v1.6$ (2245.93), $\text{hK}_v1.3/\text{KCNA3}$ (1006.48), каналы обратного выпрямления *Drosophila Shaker IR* (94.25) и $\text{K}_v1.1$ (~3000) [102].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенные данные по структурным особенностям и изученной биологической активности с разбиением по структурным классам морских анемонов имеет не только описательное значение. При обнаружении новых полипептидов, особенно современными высокопроизводительными методами геномики, транскриптомики и протеомики, в руках исследователей имеются только данные о первичной структуре соединения. Перспективность и целесообразность дальнейшего изучения таких новых компонентов всегда находится под вопросом. Приведенные данные обо всех известных пока структурах полипептидов из морских анемонов и их функциональности, по нашему мнению, поможет в выборе дальнейшей стратегии исследования новых полипептидов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда грант № 14-24-00118.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Andreev Y.A., Vassilevski A.A., Kozlov S.A. // *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* 2012. V. 6. P. 35–45.
2. Lewis R.J., Garcia M.L. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003. V. 2. P. 790–802.
3. Baron A., Diochota S., Salinas M., Devala E., Noëla J., Lingueglia E. // *Toxicol.* 2013. V. 75. P. 187–204.
4. Diochot S., Baron A., Rash L.D., Deval E., Escoubas P., Scarzello S., Salinas M., Lazdunski M. // *EMBO J.* 2004. V. 23(7). P. 1516–1525.
5. Frazão B., Vasconcelos V., Antunes A. // *Mar. Drugs.* 2012. V. 10(8). P. 1812–1851.
6. Kem W.R., Pennington M.W., Norton R.S. // *Perspect. Drug Discov. Des.* Kluwer Academic Publishers, 1999. V. 15–16. P. 111–129.
7. Klinger A.B., Eberhardt M., Link A.S., Namer B., Kutsche L.K., Schuy E.T., Sittl R., Hoffmann T., Alzheimer C., Huth T., Carr R.W., Lampert A. // *Mol. Pain.* 2012. V. 8. P. 69.
8. Mizuno M., Ito Y., Morgan B.P. // *Mar. Drugs.* 2012. V. 10(7). P. 1582–1604.
9. Mourão C.B.F., Schwartz E.F. // *Mar. Drugs.* 2013. V. 11(6). P. 2069–2112.
10. Moran Y., Gordon D., Gurevitz M. // *Toxicol.* 2009. V. 54(8). P. 1089–1101.
11. Ramezanpour M., da Silva K.B., Sanderson B.J.S. // *Cytotechnology.* 2014. V. 66(5). P. 845–852.
12. Kozlov S.A., Lazarev V.N., Kostryukova E.S., Selezneva O.V., Ospanova E.A., Alexeev D.G., Govorun V.M., Grishin E.V. // *Sci. Data.* 2014. V. 1. P. 140023.
13. Craik D.J., Daly N.L., Waine C. // *Toxicol.* 2001. V. 39(1). P. 43–60.
14. Norton R.S., Pallaghy P.K. // *Toxicol.* 1998. V. 36(11). P. 1573–1583.
15. Kozlov S.A., Grishin E.V. // *BMC Genomics.* 2011. V. 12(1). P. 88.
16. King G.F., Gentz M.C., Escoubas P., Nicholson G.M. // *Toxicol.* 2008. V. 52(2). P. 264–276.
17. Oliveira J.S., Fuentes-Silva D., King G.F. // *Toxicol.* 2012. V. 60(4). P. 539–550.
18. Kozlov S.A., Grishin E.A. // *Peptides.* 2012. V. 33(2). P. 240–244.
19. Kozlov S.A., Grishin E.V. // *Toxicol.* 2005. V. 46(6). P. 672–686.
20. Kozlov S.A., Grishin E.V. // *Toxicol.* 2007. V. 49(5). P. 721–726.
21. Wunderer G., Eulitz M. // *Eur. J. Biochem.* 1978. V. 89(1). P. 11–17.
22. Зыкова Т.А., Козловская Э.П., Еляков Г.Б. // *Био-орган. химия.* 1988. Т. 14(7). С. 878–882. [Zykova T.A., Kozlovskaya E.P., Eliakov G.B. // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 1988. V. 14(7). P. 878–882.]
23. Зыкова Т.А., Козловская Э.П. // *Биоорган. химия.* 1989. Т. 15(10). С. 1301–1306. [Zykova T.A., Kozlovskaya E.P. // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 1988. V. 15(10). P. 1301–1306.]
24. Wunderer G., Fritz H., Wachter E., Machleidt W. // *Eur. J. Biochem.* 1976. V. 68(1). P. 193–198.
25. Consortium T.U. // *Nucleic Acids Res.* 2015. V. 43. P. 204–212.
26. Vassilevski A.A., Kozlov S.A., Grishin E.V. // *Biochemistry (Mosc.).* 2009. V. 74(13). P. 1505–1534.
27. Nicosia A., Maggio T., Mazzola S., Cuttitta A. // *Mar. Drugs.* 2013. V. 11(11). P. 4213–4231.
28. Reyes-Velasco J., Card D.C., Andrew A.L., Shaney K.J., Adams R.H., Schield D.R., Casewell N.R., Mackessy S.P., Castoe T.A. // *Mol. Biol. Evol.* 2014. V. 32(1). P. 173–183.
29. Starcevic A., Moura-da-Silva A.M., Cullum J., Hranueli D., Long P.F. // *Toxicol.* 2015. V. 95. P. 84–92.
30. Undheim E.A., Jones A., Clauser K.R., Holland J.W., Pineda S.S., King G.F., Fry B.G. // *Mol. Biol. Evol.* 2014. V. 31(8). P. 2124–2148.
31. Sunagar K., Undheim E.A., Chan A.H., Koludarov I., Muñoz-Gómez S.A., Antunes A., Fry B.G. // *Toxins (Basel).* 2013. V. 5(12). P. 2456–2487.
32. Junqueira-de-Azevedo I.L., Bastos C.M., Ho P.L., Luna M.S., Yamanouye N., Casewell N.R. // *Mol. Biol. Evol.* 2014. V. 32(3). P. 345–366.
33. Kozlov S.A., Vassilevski A.A., Grishin E.V. Secreted protein and peptide biosynthesis: precursor structures and processing mechanisms. Protein biosynthesis. Toma E. Es / Eds. Esterhouse T.E., Petrinis L.B. New York: Nova Biomedical Books, 2009. P. 225–248.
34. Kozlov S.A., Vassilevski A.A., Feofanov A.V., Surovoy A.Y., Karpunin D.V., Grishin E.V. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281(30). P. 20983–20992.
35. Honma T., Kawahata S., Ishida M., Nagai H., Nagashima Y., Shiomi K. // *Peptides.* 2008. V. 29(4). P. 536–544.
36. Honma T., Hasegawa Y., Ishida M., Nagai H., Nagashima Y., Shiomi K. // *Toxicol.* 2005. V. 45(1). P. 33–41.
37. Cassoli J.S., Verano-Braga T., Oliveira J.S., Montandon G.G., Cologna C.T., Peigneur S., Pimenta A.M., Kjeldsen F., Roepstorff P., Tytgat J., de Lima M.E. // *J. Proteomics.* 2013. V. 87. P. 89–102.
38. Pallaghy P.K., Scanlon M.J., Monks S.A., Norton R.S. // *Biochemistry.* 1995. V. 34(11). P. 3782–3794.
39. Monks S.A., Pallaghy P.K., Scanlon M.J., Norton R.S. // *Structure.* 1995. V. 3(8). P. 791–803.
40. Widmer H., Billeter M., Wüthrich K. // *Proteins.* 1989. V. 6(4). P. 357–371.
41. Salceda E., Pérez-Castells J., López-Méndez B., Garrateix A., Salazar H., López O., Aneiros A., Ständker L., Béress L., Forssmann W.G., Soto E., Jiménez-Barbero J., Giménez-Gallego G. // *Biochem. J.* 2007. V. 406(1). P. 67–76.
42. Wilcox G.R., Fogh R.H., Norton R.S. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268(33). P. 24707–24719.
43. Kelso G.J., Blumenthal K.M. // *Toxicol.* 1998. V. 36(1). P. 41–51.
44. Cunha R.B., Santana A.N., Amaral P.C., Carvalho M.D., Carvalho D.M., Cavalheiro E.A., Maigret B., Ricart C.A., Cardi B.A., Sousa M.V., Carvalho K.M. // *Toxicol.* 2005. V. 45(2). P. 207–217.

45. Zaharenko A.J., Ferreira W.A., Jr., de Oliveira J.S., Konno K., Richardson M., Schiavon E., Wanke E., de Freitas J.C. // *Toxicon*. 2008. V. 51(7). P. 1303–1307.
46. Wanke E., Zaharenko A.J., Redaelli E., Schiavon E. // *Toxicon*. 2009. V. 54(8). P. 1102–1111.
47. Байдан Л.В., Козловская Э.П., Тишин С.М. // Докл. АН СССР. 1981. V. 259 (4). P. 1000–1002.
48. Махнырь В.М., Козловская Э.П. // *Биоорган. химия*. 1990. Т. 16(5). С. 643–648. [Махнырь В.М., Козловская Э.П. // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 1990. V. 16(5). P. 643–648.]
49. Norton T.R. *Drug and Food from Sea: Myth or Reality // Drug and Food from Sea: Myth or Reality*. Norman: Oklahoma Press, 1978. P. 37–50.
50. Dias-Kadambi B.L., Combs K.A., Drum C.L., Hanck D.A., Blumenthal K.M. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271(39). P. 23828–23835.
51. Quignard J.F., Ryckwaert F., Albat B., Nargeot J., Richard S. // *Circ. Res.* 1997. V. 80(3). P. 377–382.
52. Goudet C., Ferrer T., Galàn L., Artiles A., Batista C.F., Possani L.D., Alvarez J., Aneiros A., Tytgat J. // *Br. J. Pharmacol.* 2001. V. 134(6). P. 1195–1206.
53. Oliveira J.S., Redaelli E., Zaharenko A.J., Cassulini R.R., Konno K., Pimenta D.C., Freitas J.C., Clare J.J., Wanke E. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279(32). P. 33323–33335.
54. Zaharenko A.J., Schiavon E., Ferreira W.A., Jr., Lecchi M., de Freitas J.C., Richardson M., Wanke E. // *Peptides*. 2012. V. 34(1). P. 158–167.
55. Billen B., Debaveye S., Béress L., Garateix A., Tytgat J. // *Front. Pharmacol.* 2010. V. 1. P. 133.
56. Chagot B., Diochot S., Pimentel C., Lazdunski M., Darbon H. // *Proteins*. 2005. V. 59(2). P. 380–386.
57. Chagot B., Escoubas P., Diochot S., Bernard C., Lazdunski M., Darbon H. // *Protein Sci.* 2005. V. 14(8). P. 2003–2010.
58. Driscoll P.C., Gronenborn A.M., Beress L., Clore G.M. // *Biochemistry*. 1989. V. 28(5). P. 2188–2198.
59. Diochot S., Loret E., Bruhn T., Béress L., Lazdunski M. // *Mol. Pharmacol.* 2003. V. 64(1). P. 59–69.
60. Peigneur S., Béress L., Möller C., Marí F., Forssmann W.G., Tytgat J. // *FASEB J.* 2012. V. 26 (12). P. 5141–5151.
61. Diochot S., Schweitz H., Béress L., Lazdunski M. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273(12). P. 6744–6749.
62. Osmakov D.I., Andreev Y.A., Kozlov S.A. // *Biochemistry (Mosc.)*. 2014. V. 79(13). P. 1528–1545.
63. Tudor J.E., Pallaghy P.K., Pennington M.W., Norton R.S. // *Nat. Struct. Biol.* 1996. V. 3(4). P. 317–320.
64. Dang B., Kubota T., Mandal K., Bezanilla F., Kent S.B. // *J. Am. Chem. Soc.* 2013. V. 135(32). P. 11911–11919.
65. Kalman K., Pennington M.W., Lanigan M.D., Nguyen A., Rauer H., Mahnir V., Paschetto K., Kem W.R., Grissmer S., Gutman G.A., Christian E.P., Cahalan M.D., Norton R.S., Chandy K.G. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273(49). P. 32697–32707.
66. Pennington M.W., Beeton C., Galea C.A., Smith B.J., Chi V., Monaghan K.P., Garcia A., Rangaraju S., Giuffrida A., Plank D., Crossley G., Nugent D., Khaytin I., Lefievre Y., Peshenko I., Dixon C., Chauhan S., Orzel A., Inoue T., Hu X., Moore R.V., Norton R.S., Chandy K.G. // *Mol. Pharmacol.* 2009. V. 75(4). P. 762–773.
67. Dauplais M., Lecoq A., Song J., Cotton J., Jamin N., Gilquin B., Roumestand C., Vita C., de Medeiros C.L., Rowan E.G., Harvey A.L., Ménez A. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272(7). P. 4302–4309.
68. Gendeh G.S., Young L.C., de Medeiros C.L., Jeyaseelan K., Harvey A.L., Chung M.C. // *Biochemistry*. 1997. V. 36(38). P. 11461–11471.
69. Hasegawa Y., Honma T., Nagai H., Ishida M., Nagashima Y., Shiomi K. // *Toxicon*. 2006. V. 48(5). P. 536–542.
70. Minagawa S., Ishida M., Nagashima Y., Shiomi K. // *FEBS Lett.* 1998. V. 427(1). P. 149–151.
71. Schweitz H., Bruhn T., Guillemare E., Moinier D., Lancelin J.M., Béress L., Lazdunski M. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270(42). P. 25121–25126.
72. Cotton J., Crest M., Bouet F., Alessandri N., Gola M., Forest E., Karlsson E., Castañeda O., Harvey A.L., Vita C., Ménez A. // *Eur. J. Biochem.* 1997. V. 244 (1). P. 192–202.
73. Orts D.J., Peigneur S., Madio B., Cassoli J.S., Montandon G.G., Pimenta A.M., Bicudo J.E., Freitas J.C., Zaharenko A.J., Tytgat J. // *Mar. Drugs*. 2013. V. 11(3). P. 655–679.
74. Krebs H.C.H.G.G. // *Naturwissenschaften*. 1987. V. 74. P. 395–396.
75. Tschesche H., Kolkenbrock H., Bode W. // *Biol. Chem. Hoppe. Seyler*. 1987. V. 368 (10). P. 1297–1304.
76. Hemmi H., Kumazaki T., Yoshizawa-Kumagaye K., Nishiuchi Y., Yoshida T., Ohkubo T., Kobayashi Y. // *Biochemistry*. 2005. V. 44(28). P. 9626–9636.
77. Antuch W., Berndt K.D., Chávez M.A., Delfín J., Wüthrich K. // *Eur. J. Biochem.* 1993. V. 212(3). P. 675–684.
78. García-Fernández R., Pons T., Meyer A., Perbandt M., González-González Y., Gil D., de los Angeles Chávez M., Betzel C., Redecke L. // *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 2012. V. 68 (11). P. 1289–1293.
79. García-Fernández R., Pons T., Perbandt M., Valiente P.A., Talavera A., González-González Y., Rehders D., Chávez M.A., Betzel C., Redecke L. // *J. Struct. Biol.* 2012. V. 180(2). P. 271–279.
80. Peigneur S., Billen B., Derua R., Waelkens E., Debaveye S., Béress L., Tytgat J. // *Biochem. Pharmacol.* 2011. V. 82(1). P. 81–90.
81. Minagawa S., Ishida M., Shimakura K., Nagashima Y., Shiomi K. // *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 1997. V. 118(2). P. 381–386.
82. Minagawa S., Sugiyama M., Ishida M., Nagashima Y., Shiomi K. // *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 2008. V. 150(2). P. 240–245.
83. Wunderer G., Machleidt W., Fritz H. // *Methods Enzymol.* 1980. V. 80. P. 816–820.
84. Bhoola K.D., Figueroa C.D., Worthy K. // *Pharmacol. Rev.* 1992. V. 44. № 1. P. 1–80.
85. Diamandis E.P., Yousef G.M. // *Clin. Chem.* 2002. V. 48(8). P. 1198–1205.
86. Сокотун И.Н., Лейченко Е.В., Вакорина Т.И., Еськов А.А., Ильина А. П., Монастырская М.М., Козловская Э.П. // *Биоорган. химия*. 2007. Т. 33(4). С. 448–455. [Sokotun I.N., Leichenko E.V., Vakorina T.I., Es'kov A.A., Il'ina A.P., Monastyrnaia M.M., Kozlovskaya E.P. // *Bioorgan. Chem.* 2007. T. 33(4). P. 448–455.]

- kaia E.P.* // Russ. J. Bioorgan. Chem. 2007. V. 33(4). P. 415–422.]
87. *Delfin J., Martínez I., Antuch W., Morera V., González Y., Rodríguez R., Márquez M., Saroyán A., Larionova N., Díaz J., Padrón G., Chávez M.* // *Toxicon*. 1996. V. 34, № 11–12. P. 1367–1376.
 88. *Andreev Y.A., Kozlov S.A., Koshelev S.G., Ivanova E.A., Monastyrnaya M.M., Kozlovskaya E.P., Grishin E.V.* // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 35. P. 23914–23 921.
 89. *Козлов С.А., Андреев Я.А., Мурашев А.Н., Скобцов Д.И., Дьяченко И.А., Гришин Е.В.* // *Биоорганическая химия*. 2009. Т. 35(6). С. 789–798. [*Kozlov S.A., Andreev Y.A., Murashev A.N., Skobtsov D. I., D'yachenko I.A., Grishin E.V.* // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 2009. V. 35(6). P. 711–719.]
 90. *Andreev Y.A., Kozlov S.A., Korolkova Y.V., Dyachenko I.A., Bondarenko D.A., Skobtsov D.I., Murashev A.N., Kotova P.D., Rogachevskaja O.A., Kabanova N.V., Kolesnikov S.S., Grishin E.V.* // *Mar. Drugs*. 2013. V. 11(12). P. 5100–5115.
 91. *Ishikawa Y., Onodera K., Takeuchi A.* // *J. Neurochem.* 1979. V. 33(1). P. 69–73.
 92. *Nishida S., Fujita S., Warashina A., Satake M., Tamiya N.* // *Eur. J. Biochem.* 1985. V. 150(1). P. 171–173.
 93. *Manoleras N., Norton R.S.* // *Biochemistry*. 1994. V. 33(37). P. 11051–11061.
 94. *Moran Y., Kahn R., Cohen L., Gur M., Karbat I., Gordon D., Gurevitz M.* // *Biochem. J.* 2007. V. 406(1). P. 41–48.
 95. *Ständker L., Béress L., Garateix A., Christ T., Ravens U., Salceda E., Soto E., John H., Forssmann W.G., Aneiros A.* // *Toxicon*. 2006. V. 48(2). P. 211–220.
 96. *Schweitz H., Vincent J.P., Barhanin J., Frelin C., Linden G., Hugues M., Lazdunski M.* // *Biochemistry*. 1981. V. 20(18). P. 5245–5252.
 97. *Kono A., Honma T., Shiomi K.* // *Fish. Sci.* 2014. V. 81(1). P. 187–192.
 98. *Honma T., Minagawa S., Nagai H., Ishida M., Nagashima Y.S.K.* // *Toxicon*. 2004. V. 46. P. 768–774.
 99. *Osmakov D.I., Kozlov S.A., Andreev Y.A., Koshelev S.G., Sanamyan N.P., Sanamyan K.E., Dyachenko I.A., Bondarenko D.A., Murashev A.N., Mineev K.S., Arseniev A.S., Grishin E.V.* // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288(32). P. 23 116–23 127.
 100. *Zaharenko A.J., Ferreira W.A., Jr., Oliveira J.S., Richardson M., Pimenta D.C., Konno K., Portaro F.C., de Freitas J.C.* // *Comp. Biochem. Physiol. Part D. Genomics Proteomics*. 2008. V. 3(3). P. 219–225.
 101. *Rodríguez A.A., Salceda E., Garateix A.G., Zaharenko A.J., Peigneur S., López O., Pons T., Richardson M., Díaz M., Hernández Y., Ständker L., Tytgat J., Soto E.* // *Peptides*. 2014. V. 53. P. 3–12.
 102. *Orts D.J., Moran Y., Cologna C.T., Peigneur S., Madio B., Praher D., Quinton L., De Pauw E., Bicudo J.E., Tytgat J., de Freitas J.C.* // *FEBS J.* 2013. V. 280(19). P. 4839–4852.
 103. *Huson D.H., Scornavacca C.* // *Syst. Biol.* 2012. V. 61(6). P. 1061–1067.
 104. *Muller Y.A., Heiring C., Misselwitz R., Welfle K., Welfle H.* // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277(45). P. 43410–43416.
 105. *Benemei S., Patacchini R., Trevisani M., Geppetti G.* TRP channels // *Curr. Opin. Pharmacol.* 2015. V. 22C. P. 18–23.
 106. *Shiomi K., Qian W.-H., Lin X.-Y., Shimakura K., Nagashima Y.I.M.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 1996. V. 1335. P. 191–198.

Structural Features of Cysteine-Stabilized Polypeptides from Sea Anemones Venoms

A. N. Mikov[#], S. A. Kozlov

[#]Phone: +7 (495) 336-65-40; e-mail: mikov.alexander@gmail.com

Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997 Russia

Nowadays, venom-based drug discovery becomes popular again: pharmaceutical companies evaluate animal venom potential as a combinatorial library of biologically-active compounds. Collaborations with research groups from academia are intensified, new toxins are being investigated, among which polypeptides are of paramount importance. Sea anemones produce the most diversified, from structural point of view, polypeptide venom components among other animals. This particular review considers known polypeptide toxins from sea anemones, basically taking into account its classification by primary structural features. The most important functional characteristics are analyzed in each structural class.

Keywords: sea anemones, polypeptide toxins, structural motifs