

Р.С. КАЛИНА, Е.В. ЛЕЙЧЕНКО,  
М.М. МОНАСТЫРНАЯ, Э.П. КОЗЛОВСКАЯ

## Нейротоксины актиний как инструмент воздействия на работу нервной системы

*Нейро- и кардиотоксины актиний, активаторы потенциал-зависимых натриевых каналов ( $Na_v$ ), являются основными компонентами яда актиний и максимально эффективными природными токсинами. Они рассматриваются в качестве перспективных молекулярных инструментов исследования механизма функционирования  $Na_v$  каналов, которые, в свою очередь, являются мишенью анестетиков, антидепрессантов, противосудорожных и антиаритмических препаратов. В лаборатории химии пептидов ТИБОУ ДВО РАН структуры и биологическая активность нейротоксинов актиний структурного типа II впервые были описаны около 35 лет назад. В настоящее время, в связи с большим интересом к механизмам регулирования активности ионных каналов с помощью природных токсинов-модуляторов, мы возобновили исследования взаимодействия нейротоксинов RpII и RTX-III с  $Na_v$  каналами млекопитающих и насекомых.*

*Ключевые слова: актинии, пептиды, нейротоксины, модуляторы ионных каналов, потенциал-зависимые натриевые каналы ( $Na_v$ ).*

**Neurotoxins from sea anemones as an instrument for intervention into the nervous system activity.**  
R.S. KALINA, E.V. LEYCHENKO, M.M. MONASTYRNAYA, E.P. KOZLOVSKAYA (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok).

*Neuro- and cardiotoxins from sea anemones, activators of voltage-gated sodium channels ( $Na_v$ ), are the major components of sea anemone venom and the most efficient natural toxins. They are considered as promising molecular tools for studying the mechanism of  $Na_v$  channels action. These channels are target for anesthetics, antidepressants, anticonvulsants and antiarrhythmic drugs. Structure and biological activity of structural type II neurotoxins from sea anemone were first described at the Laboratory of Peptide Chemistry, PIBOC FEB RAS, about 35 years ago. Currently, in relation to the great interest in regulation the activity of ion channels using natural toxin modulators, we have resumed studies of neurotoxins RpII and RTX-III interaction with mammalian and insect  $Na_v$  channels.*

*Key words: sea anemones, peptides, neurotoxins, modulators of ion channels, voltage-dependent sodium channels ( $Na_v$ ).*

Природные нейротоксины известны человечеству на протяжении многих тысячелетий. Наконечники стрел, обработанные ядами растений и животных, стали первым освоенным человеком химическим оружием. Сам термин токсинология берет начало в греческом языке, где слова «toxikos» и «toxikon» были связаны со стрельбой из лука. Лишь много позже нейротоксины получили более широкое применение в мирных сферах, таких как медицина и сельское хозяйство [3, 9]. На сегодняшний день необходимым условием

\*КАЛИНА Римма Сергеевна – младший научный сотрудник, ЛЕЙЧЕНКО Елена Владимировна – кандидат химических наук, заведующая лабораторией, МОНАСТЫРНАЯ Маргарита Михайловна – доктор химических наук, ведущий научный сотрудник, КОЗЛОВСКАЯ Эмма Павловна – доктор химических наук, заведующая лабораторией (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, Владивосток).

\*E-mail: kalinarimma@gmail.com

использования любого химического соединения является выяснение его механизма действия, на что и направлены усилия огромного количества исследователей-токсикологов. Кроме того, актуальными задачами исследований являются изучение природного разнообразия токсинов, в том числе нейротоксинов, и оптимизация структур их уже известных молекул.

Нейротоксины контролируют электрическую активность нейронов, взаимодействуя с ионными каналами, представляющими собой семейство разнообразных трансмембранных белков, предназначенных для обмена ионами и небольшими молекулами с окружающей средой [14]. Исследованиями, тесно связавшими токсикологию с изучением ионных каналов, стали эксперименты Т. Narahashi и др., сообщивших в 1964 г. о блокировании токсином пуфферовых рыб – тетродотоксином (ТТХ) – потенциалзависимых натриевых каналов ( $Na_v$ ) [14]. Поскольку именно их активация необходима для развития потенциала действия, некоторые специалисты называют  $Na_v$  «суррогатом жизненного духа», того, что обеспечивает поддержание жизни в высших организмах [9]. В 1963 г. А. Hodgkin и А. Huxley получили Нобелевскую премию в области физиологии и медицины за разработку теории, описывающей потенциалы действия и роль натриевых каналов в их формировании [13]. Девять подтипов  $Na_v$  избирательно экспрессируются в тканях центральной нервной системы (ЦНС) ( $Na_v1.1-1.3$ ,  $Na_v1.6$ ), периферической нервной системы (ПНС) ( $Na_v1.7-1.9$ ), кардиомиоцитах ( $Na_v1.5$ ) и мышечных клетках ( $Na_v1.4$ ) [9, 13].

Патологии, связанные с изменением активности  $Na_v$  каналов – аритмия и сердечная недостаточность, паралич, атаксия и миотония, эпилепсия, болевой синдром и рак [3, 9] – могут быть скорректированы специфическими модуляторами  $Na_v$ . В современной фармакологии широко применяются низкомолекулярные внутриклеточные блокаторы поры  $Na_v$  каналов – обезболивающие, антидепрессанты, антиконвульсанты или антиаритмические препараты [3, 9, 13]. Основным требованием к потенциальным лекарственным средствам является их селективность. Побочные эффекты со стороны сердечно-сосудистой, опорно-двигательной систем или ЦНС недопустимы для анальгетиков, ингибирующих активность нейронов ПНС. В связи с этим ведется активный поиск селективных ингибиторов  $Na_v1.7-1.9$ , потенциальных мощных анальгетиков, лишенных побочных эффектов опиатов [9]. Видоспецифичные нейротоксины, малотоксичные для млекопитающих, могут быть использованы в качестве пестицидов [14].

Неудивительно, что  $Na_v$  каналы, этот важнейший элемент сигнальной системы любого многоклеточного организма, стали главной мишенью нейротоксинов, которые животные и растения используют для защиты или нападения [9]. Функциональная субъединица  $Na_v$  – сложноорганизованный белок, имеющий по крайней мере девять различных сайтов связывания токсинов, блокаторов поры или аллостерических модуляторов активации/инактивации канала [9, 13, 14]. Естественный отбор закрепил активаторы и ингибиторы  $Na_v$  в качестве обязательных компонентов ядов пауков, пчел, скорпионов, змей, моллюсков конусов и актиний [9]. На ранних этапах изучения аффинные и селективные токсины, связывающиеся с каналами, сыграли особенно заметную роль в структурно-функциональных исследованиях  $Na_v$ .

Профессор W. Catterall, стоявший у истоков исследования структуры и функции  $Na_v$ , отмечает, что был всецело захвачен возможностями использования специфичных нейротоксинов в качестве инструментов исследования для идентификации, очистки белков натриевых каналов и определения их биофизических свойств [3]. В то время, когда ничего еще не было известно о строении  $Na_v$ , он использовал  $\alpha$ -токсин скорпиона и паралитический токсин моллюсков, сакситоксин (STX), с помощью которых установил, что  $Na_v$  канал включает пороформирующую  $\alpha$ -субъединицу и две вспомогательные  $\beta$ -субъединицы, лишь одна из которых образует ковалентные связи с  $\alpha$ -субъединицей [3].

Определение структуры, механизма функционирования и физиологической роли ионных каналов всегда было исключительно сложной задачей. С того момента, как в 1952 г.

А. Hodgkin, В. Katz и А. Huxley впервые опубликовали записи натриевых токов через мембрану нервной клетки, прошло еще 30 лет, прежде чем аминокислотная последовательность  $Na_v$  канала электрического угря *Electrophorus electricus* была определена [3, 9]. Начиная с 2012 г. появилась возможность устанавливать также и пространственные структуры бактериальных и эукариотических  $Na_v$ , даже каналов человека ( $Na_v1.4\beta1$ ) в комплексах с токсинами-блокаторами поры и аллостерическими модуляторами яда тарантулов ( $Na_v1.7\beta1\text{-}\beta2$  с ТТХ/ProTx-II и STX/HWTx-IV) [12].

Таким образом, развитие представлений о механизме функционирования  $Na_v$  каналов на протяжении десятилетий было тесно связано с применением нейротоксинов-модуляторов. Такие блокаторы, как ТТХ и STX, применяются при изучении транспорта ионов через канал, а также строения селективного фильтра. Сайт их связывания с каналом считается наиболее изученным. Чувствительность различных подтипов  $Na_v$  к ТТХ до сих пор используется для классификации каналов [13]. Модуляторы воротного механизма каналов,  $\alpha$ - и  $\beta$ -токсины скорпионов, позволили подтвердить различия активированного и инактивированного состояний потенциал-чувствительных доменов  $Na_v$  [3].

Нейро- и кардиотоксины стали первой описанной структурной группой токсинов актиний. Во многом этому способствовал тот факт, что активаторы  $Na_v$  каналов составляют основную часть яда актинии [4]. На сегодняшний день определены первичные структуры более 50 нейротоксинов актиний, объединенных в четыре структурных типа исходя из гомологии их аминокислотных последовательностей. Первой установленной аминокислотной последовательностью пептида актинии стала последовательность нейротоксина типа I, АТХ-II из *Anemonia sulcata*, опубликованная в 1976 г. G. Wunderer и соавторами [4]. Параллельно велась работа по изучению антоплеуринов А и В (ApA и ApB) из *Anthopleura xanthogrammica* [4]. По сей день эти три пептида остаются наиболее изученными с точки зрения пространственной структуры и важности конкретных аминокислотных остатков (а.о.) в сохранении их биологической активности [10], главным образом кардиотоксичности [5]. В 1976 г., когда впервые было описано парализующее действие токсинов актиний и их способность продлевать потенциал действия, идея о том, что существуют различные изоформы каналов  $Na_v$ , еще не была признана. Однако уже тогда было очевидно, что исследуемые токсины актиний специфичны к тканям сердца. Самым селективным в отношении основного подтипа натриевых каналов кардиомиоцитов,  $Na_v1.5$ , считается пептид ApA [5].

О первом токсине – представителе второго структурного типа (RpII из *Heteractis magnifica*) сообщили Н. Schweitz и соавторы в 1985 г. [11]. Информация о первичной структуре RpII была уточнена год спустя и дополнена данными ЯМР-спектроскопии [15]. В 90-е годы уже было известно, что пептиды структурных типов I и II очень похожи (включают от 46 до 54 а.о и три дисульфидные связи), а их пространственная структура представляет собой компактный  $\beta$ -лист в сочетании с гибкими петлями [4, 6, 15], обеспечивающими высокую аффинность связывания с каналом и медленную кинетику ассоциации/диссоциации токсина [5].

В период с 1985 по 1991 г. сотрудниками лаборатории химии пептидов (ЛХП) ТИБОХ ДВО РАН выделено пять высокогомологичных пептидов II структурного типа, RTX-I – RTX-V, из тропической актинии *Heteractis crispa* [2]. Методом ЯМР-спектроскопии была изучена пространственная структура RTX-III [6], а также показана ведущая роль нескольких основных остатков в сохранении его биологической активности (высокой токсичности для млекопитающих) в сочетании с незначительным вкладом карбоксильных групп [8]. Тогда же было установлено, что молекула RTX-III, связываясь с внеклеточным участком канала, замедляет кинетику инактивации  $Na_v$  и делает ее неполной в результате аллостерической модификации воротного механизма канала. Взаимодействие с токсином вызывает обширные конформационные изменения канала, выходящие далеко за пределы сайта связывания пептида (сайт 3) и затрагивающие как внеклеточные, так и внутриклеточные участки  $Na_v$ . Совместная аппликация RTX-III и ТТХ продемонстрировала, что

после модификации  $Na_v$  канала токсином актинии требуется в два раза больше молекул ТТХ для его инактивации [1].

На сегодняшний день второй структурный тип включает всего восемь токсинов [4]. Пространственная структура одного из них, Sh1 из *Stichodactyla helianthus*, была установлена с помощью ЯМР-спектроскопии [4]. Структурно-функциональные взаимосвязи этих пептидов практически не исследованы, и остаются вопросы, связанные с архитектурой комплексов и молекулярными основами избирательного взаимодействия токсинов с определенными подтипами  $Na_v$ .

В 1980–1990-х годах в электрофизиологических экспериментах использовали линии клеток нейробластомы, изолированные нейроны крыс и т.п., экспрессирующие сразу несколько подтипов  $Na_v$ . С развитием технологии экспрессии различных белков в ооцитах появилась возможность определить фармакологические профили нейротоксинов в отношении ряда натриевых каналов млекопитающих и насекомых. В связи с этим в последние пять лет в ЛХП ТИБОХ ДВО РАН возобновились исследования модулирующего эффекта токсинов RTX-III и RpII на токи натриевых каналов. Полученные результаты электрофизиологических экспериментов демонстрируют, что эти пептиды, как и большинство нейротоксинов актиний, не являются специфичными и способны активировать  $Na_v$  как млекопитающих, так и насекомых. Высокая токсичность RTX-III и RpII также получила объяснение: они вызывают деполяризацию мембран нейронов ЦНС, прерывая передачу электрических импульсов, не затрагивая активность натриевых каналов мышц, сердца или  $Na_v1.8$  в ПНС. Тот факт, что RTX-III и RpII увеличивают амплитуду натриевых токов минимум в два раза и полностью ингибируют инактивацию  $Na_v$  насекомых, делает их перспективными инсектотоксинами [7].

Согласно существующей модели связывание нейротоксинов с сайтом 3 стабилизирует релаксированное состояние домена IV, управляющего инактивацией канала, и препятствует его транслокации, необходимой для закрытия поры [13, 14]. При этом происходят конформационные изменения трех оставшихся доменов, приводящие к открытию поры, и токсин фиксирует канал в проводящем состоянии. Деполяризация мембраны способствует диссоциации токсинов актиний, что свидетельствует о высокой прочности комплекса токсина с каналом, находящимся в закрытом состоянии, и низкой – с инактивированным каналом [5]. Аналогичным образом действуют  $\alpha$ -токсины скорпионов и некоторые токсины пауков, которые также связываются с сайтом 3 натриевых каналов [13, 14].

В качестве инструментов фундаментальных исследований токсины актиний могут быть использованы для определения механизма действия лигандов и процесса инактивации  $Na_v$ . Совместное применение лидокаина, внутриклеточного блокатора поры, и АрА ведет к аддитивному ингибированию воротных токов, ассоциированных с движением каждого из доменов канала. Это позволило установить, что стабилизация инактивированного  $Na_v$  канала лидокаином в большей степени достигается за счет управления доменом III, нежели доменом IV, с которым связывается АрА [5]. Кроме того, АрВ был использован, в сочетании с токсинами пауков ProTx-II и HWTx-IV, для установления роли отдельных потенциал-чувствительных доменов в открытии поры и инициации процесса быстрой инактивации при транслокации домена IV [16]. Таким образом, токсины актиний являются важным и перспективным инструментом исследования воротных токов, позволяя более детально описать роль домена IV в работе канала [13].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Сорокина З.А., Чижмаков И.В., Козловская Э.П., Вожжова Е.В., Еляков Г.Б. Положительная кооперативность связывания тетродотоксина натриевыми каналами нейронов спинальных ганглиев крыс, индуцируемая анемотоксином RTX-III // Докл. АН. 1985. Т. 282, № 2. С. 433–436.
2. Зыкова Т.А., Козловская Э.П. Аминокислотная последовательность нейротоксина I из актинии *Radianthus macrodactylus* // Биоорган. химия. 1989. Т. 15, № 10. С. 1301–1306.

3. Catterall W.A. Forty years of sodium channels: structure, function, pharmacology, and epilepsy // *Neurochem. Res.* 2017. Vol. 42, N 9. P. 2495–2504.
4. Frazão B., Vasconcelos V., Antunes A. Sea anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) toxins: an overview // *Mar. Drugs.* 2012. Vol. 10, N 8. P. 1812–1851.
5. Hanck D.A., Sheets M.F. Site-3 toxins and cardiac sodium channels // *Toxicon.* 2007. Vol. 49, N 2. P. 181–193.
6. Hinds M.G., Norton R.S. Sequential <sup>1</sup>H-NMR assignments of neurotoxin III from the sea anemone *Heteractis macrodactylus* and structural comparison with related toxins // *J. Protein Chem.* 1993. Vol. 12, N 3. P. 371–378.
7. Kalina R., Gladkikh I., Peigneur S., Dmitrenok P., Zelepuga E., Monastyrnaya M., Kozlovskaya E. Type II toxins from sea anemone *Heteractis crispera* with various effects on activation and inactivation of voltage-gated sodium channels // *Toxicon.* 2019. Vol. 159, suppl. 1. P. S18.
8. 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, N 7. P. 819–826.
9. Moczydlowski E.G. On the natural and unnatural history of the voltage-gated Na(+) channel // *Curr. Top. Membr.* 2016. Vol. 78. P. 3–36.
10. Moran Y., Cohen L., Kahn R., Karbat I., Gordon D., Gurevitz M. 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, N 29. P. 8864–8873.
11. Schweitz H., Bidard J.N., Frelin C., Pauron D., Vijverberg H.P., Mahasneh D.M., Lazdunski M., Vilbois F., Tsugita A. 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, N 14. P. 3554–3561.
12. Shen H., Liu D., Wu K., Lei J., Yan N. Structures of human Na<sub>v</sub>1.7 channel in complex with auxiliary subunits and animal toxins // *Science.* 2019. Vol. 363, N 6433. P. 1303–1308.
13. Stevens M., Peigneur S., Tytgat J. Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels // *Front. Pharmacol.* 2011. Vol. 2. P. 71. DOI: 10.3389/fphar.2011.00071
14. Suppiramaniam V., Bloemer J., Reed M., Bhattacharya S. Ion Channels // *Comprehensive Toxicology.* 3rd ed. Elsevier Inc., 2018. Vol. 6. P. 202–241.
15. Wemmer D.E., Kumar N.V., Metrone R.M., Lazdunski M., Drobny G., Kallenbach N.R. NMR analysis and sequence of toxin II from the sea anemone *Radianthus paumotensis* // *Biochemistry.* 1986. Vol. 25, N 22. P. 6842–6849.
16. 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, N 2. P. 159–167.