

УДК 577.1+577.2+577.3

НОВЫЙ АНЕМОНОТОКСИН RTX-VI ИЗБИРАТЕЛЬНО МОДУЛИРУЕТ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫЕ НАТРИЕВЫЕ КАНАЛЫ

© 2020 г. Р. С. Калина^{1,*}, С. Пеньёр², И. Н. Гладких¹, П. С. Дмитренко¹, Н. Ю. Ким¹, Е. В. Лейченко¹, М. М. Монастырская¹, Я. Титгат², Э. П. Козловская¹

Представлено академиком РАН В. А. Стонином

Поступило 03.12.2019 г.

После доработки 02.08.2020 г.

Принято к публикации 03.08.2020 г.

Из этанольного экстракта морской анемоны *Heteractis crispa* выделен новый нейротоксин RTX-VI, модулирующий потенциал-зависимые натриевые каналы (Na_v). Его аминокислотная последовательность была установлена комбинацией методов секвенирования по Эдману и тандемной масс-спектрометрии. RTX-VI является необычным природным аналогом описанного ранее анемонотоксина RTX-III. Молекула RTX-VI состоит из двух дисульфидсвязанных пептидных цепей и лишена аминокислотного остатка Arg13, важного для селективности и сродства нейротоксинов к Na_v каналам. Электрофизиологический скрининг на подтипах Na_v показал избирательное взаимодействие RTX-VI с натриевыми каналами центральной нервной системы (Na_v1.2, Na_v1.6) и каналами насекомых (BgNa_v1, VdNa_v1).

Ключевые слова: морская анемона, *Heteractis crispa*, потенциал-зависимые натриевые каналы, токсины, электрофизиология

DOI: 10.31857/S2686738920060104

Поиск соединений, способных высокоспецифично взаимодействовать с ионными каналами и/или ионотропными рецепторами, является актуальной задачей современной биоорганической химии, нейрофизиологии, токсикологии и биомедицины. В силу огромного структурного разнообразия и уникальных свойств, нейротоксины природных ядов играют центральную роль в изучении функций различных рецепторных систем сигнальных и проводящих путей организма и представляют интерес в качестве основы для дизайна новых лекарственных препаратов [1].

Морские анемоны (тип кишечнополостные) продуцируют широкий спектр нейротоксинов, модулирующих потенциал-зависимые калиевые и натриевые каналы (K_v и Na_v) [2, 3], протон-активируемые каналы (ASICs) [4], Ca²⁺-зависимые калиевые каналы (BK и SK) [5], катион неселективные каналы TRPV1 [6] и TRPA1 [7].

Модуляторы Na_v каналов – это наиболее изученная на сегодняшний день группа анемоноток-

синов отчасти потому, что они являются основными компонентами яда этих животных [3]. Токсины данной группы, связываясь с сайтом 3 (потенциал-чувствительный домен IV) Na_v каналов, способны замедлять их быструю инактивацию [1]. Эти пептиды, имеющие молекулярную массу около 5 кДа, классифицируются на основе гомологии их аминокислотных последовательностей и объединяются в четыре структурных типа [3]. Электрофизиологические исследования токсинов ShI и Rp-I – Rp-IV [8, 9] позволили установить общий механизм действия этих пептидов на каналы Na_v, но не их фармакологический профиль. При этом детальной электрофизиологической характеристики ни для одного из изученных токсинов не приводилось до настоящего момента.

В данной работе мы сообщаем об изучении нового нейротоксина RTX-VI из тропической морской анемоны *Heteractis crispa*, описываем его структурные особенности и функциональные свойства.

Недавно нами было показано, что после разделения 70% этанольного экстракта морской анемоны *H. crispa* на полихроме-1, в 20% этанольной фракции, наряду с модуляторами ASIC каналов, ингибиторами сериновых протеиназ Кунитц-типа и α-амилаз, в значительном количестве при-

¹ Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

² Католический университет Левена, Левен, Бельгия

*e-mail: kalinarimma@gmail.com

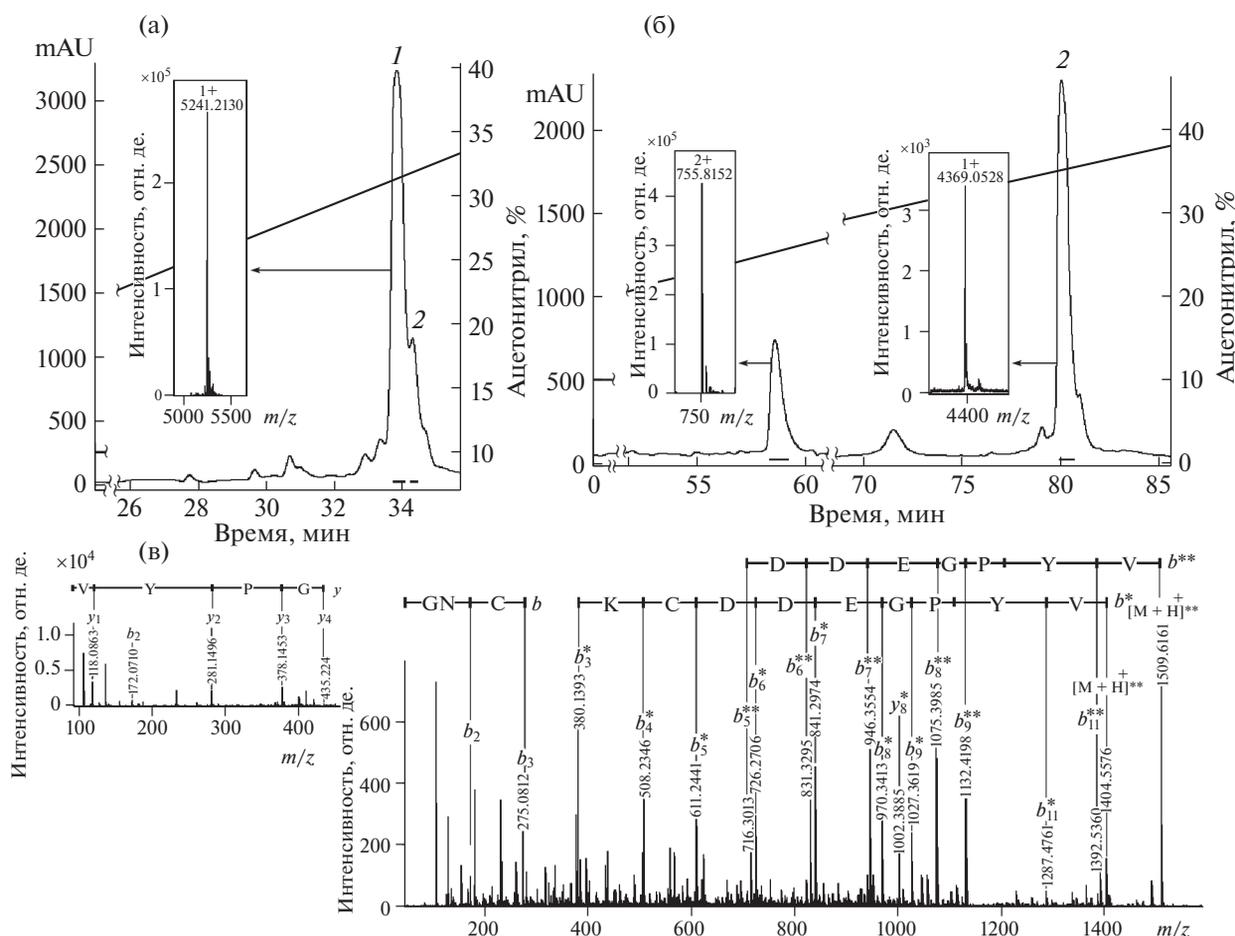


Рис. 1. ОФ ВЭЖХ токсина RTX-VI на колонке Luna C18 (10 × 250 мм) (а) и продуктов его алкилирования на колонке Nucleosil C18 (4.6 × 250 мм) (б). Во вставках показаны ИЭР масс-спектры. (в) ИЭР-МС/МС спектр однозарядного молекулярного иона алкилированного пептида 1, 1GNCKCDDDEGYPV12 (б, пик 1). Присутствие одной или двух этилпиридиловых групп в составе пептида отмечено * или ** соответственно. Сверху показаны идентифицированные фрагменты аминокислотной последовательности.

существовали нейротоксины [4]. В результате последующего разделения фракции с помощью ионообменной хроматографии (Bio-Rex70, SP-Sephadex C-25) и ОФ ВЭЖХ (Luna C18) (рис. 1а) был выделен новый токсин второго структурного типа – RTX-VI (5240.21 Да). Для определения его аминокислотной последовательности дисульфидные связи RTX-VI были восстановлены дитиотреитолом, а остатки Cys алкилированы 4-винилпиридином. После разделения ОФ ВЭЖХ продуктов алкилирования мы получили два пика с молекулярными массами 1509.61 и 4368.05 Да (рис. 1б) вместо одного пика алкилированного пептида с расчетной молекулярной массой 5877.05 Да, соответствующей модификации шести остатков цистеина. Последовательность пептида 1 была определена на основе совокупности данных тандемного масс-спектра (МС/МС) однозарядного молекулярного иона пептида 1 (1509.61 Да), содержащего пики ионов серий b и y (рис. 1в).

МС/МС спектр молекулярного иона полипротонированного пептида 2 (4368.05 Да) не содержал достаточного объема структурной информации. Его аминокислотная последовательность (35 а.о.) была определена деградацией по Эдману. Согласно данным масс-спектрометрии, С-концевой аминокислотный остаток RTX-VI был амидирован. Это согласуется с наличием постраничной модификации (отщепление С-концевого остатка глицина), обычно протекающей при созревании данных токсинов [10].

Токсин RTX-VI оказался необычным природным аналогом ранее выделенного из *H. crispus* пептида RTX-III (δ -SHTX-Hcr1a, UniProt ID: P30832) [11]. Молекула RTX-VI состоит из двух пептидных цепей (12 и 35 а.о.), соединенных двумя дисульфидными связями (C3-C43 и C5-C33, согласно RTX-III); третья дисульфидная связь локализована внутри аминокислотной цепи 2 (C26-C44). Аминокислотная последовательность пептида



Рис. 2. Аминокислотные последовательности нейротоксинов второго структурного типа из морской анемоны *H. crispa*: RTX-I (UniProt ID: P30831), RTX-II (P30783), RTX-III (P30832), RTX-IV (P30784), RTX-V (P30785) и RTX-VI. Идентичные и консервативные аминокислотные остатки показаны на темно- и светло-сером фоне соответственно.

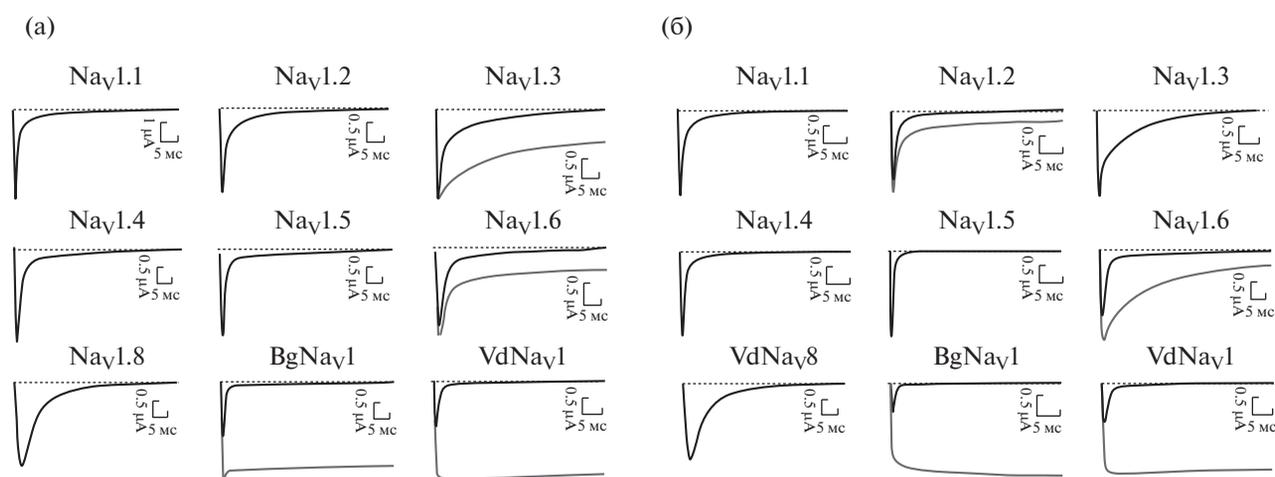


Рис. 3. Эффект токсинов RTX-III (а) и RTX-VI (б) на токи Na_v каналов млекопитающих (Na_v1.1-1.6, Na_v1.8) и насекомых (BgNa_v1, VdNa_v1), экспрессированных в ооцитах лягушки *X. laevis*. Приведены суперпозиции трех последовательных записей токов (интервал 5 с) через мембрану клетки, вызванных изменением мембранного потенциала, в условиях контроля (черная линия) и в присутствии 10 мкМ токсина (серая линия), острый эксперимент. Na⁺-токи были вызваны деполяризацией мембраны ооцита в течение 100 мс с величины поддерживаемого потенциала – 90 мВ до V_{max} (в зависимости от подтипа Na_v, величина мембранного потенциала составляла от – 10 до 15 мВ).

RTX-VI идентична последовательности RTX-III, за исключением отсутствия остатка Arg13 (рис. 2).

КД спектры пептидов RTX-III и RTX-VI практически идентичны. Около 40% пептидных цепей токсинов находится в конформации β-складка и примерно 20% представляет собой β-изгибы, оставшаяся часть (~40%) – это неупорядоченная структура. Полученные данные КД спектроскопии согласуются с описанием пространственных

структур гомологичных нейротоксинов (ArA, ShI) – скрученный антипараллельный β-лист, соединенный тремя петлями, на вершине одной из которых локализован Arg13 [12, 13].

По-видимому, новый токсин RTX-VI является результатом посттрансляционной модификации пептида RTX-III. Ранее сообщалось, что в яде паука *Cupiennius salei* обнаружен двухцепочечный пептид CSTX-13 со слабой нейротоксической ак-

тивностью, увеличивающий паралитическую активность токсина CSTX-1 [14].

Электрофизиологический скрининг токсинов RTX-III и RTX-VI на девяти подтипах Na_v каналов, экспрессированных в ооцитах лягушки *Xenopus laevis*, показал, что отсутствие Arg13 в структуре RTX-VI меняет его фармакологический профиль в отношении двух подтипов каналов центральной нервной системы. В отличие от RTX-III, модулирующего $Na_v1.3$ канал, токсин RTX-VI влияет на токи $Na_v1.2$. В то же время активность обоих пептидов в отношении семи других подтипов Na_v : каналов насекомых ($BgNa_v1$, $VdNa_v1$), скелетной мускулатуры ($Na_v1.4$), сердечной мышцы ($Na_v1.5$), центральной ($Na_v1.1$, $Na_v1.6$) и периферической ($Na_v1.8$) нервной системы млекопитающих, остается идентичной. Мы полагаем, что Arg13 скорее вносит вклад в селективность токсина по отношению к различным подтипам Na_v каналов, нежели играет решающую роль во взаимодействии токсина с каналом [1].

Таким образом, впервые из морской анемоны *H. crispa* выделен двухпочечный нейротоксин, RTX-VI. Проведено сравнительное исследование действия RTX-VI и его ближайшего гомолога RTX-III на токи семи подтипов Na_v млекопитающих и два подтипа каналов насекомых. Благодаря широкой специфичности анемонотоксинов RTX-III и RTX-VI, они могут быть использованы в качестве инсектицидов и молекулярных инструментов исследования Na_v каналов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-04-00631. Работа выполнена с использованием оборудования Дальневосточного центра структурных молекулярных исследований (ЯМР- и масс-спектрометрии) (ЦСМИ ТИБОХ ДВО РАН).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что исследования проводились при отсутствии любых коммерческих или финансовых отношений, которые могли бы быть истолкованы как потенциальный конфликт интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Deuis J., Mueller A., Israel M., et al.* The pharmacology of voltage-gated sodium channel activators // *Neuropharmacology*. 2017. V. 127. P. 87–108. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.04.0>
2. *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. V. 173. P. 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.11.019>
3. *Frazaõ B., Vasconcelos V., Antunes A.* Sea anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) toxins: an overview // *Mar. Drugs*. 2012. V. 10. № 12. P. 1812–1851. <https://doi.org/10.3390/md10081812>
4. *Kalina R., Gladkikh I., Dmitrenok P., et al.* New APETx-like peptides from sea anemone *Heteractis crispa* modulate ASIC1a channels // *Peptides*. 2018. V. 104. P. 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.04.013>
5. *Rauer H., Pennington M., Cahalan M., et al.* Structural conservation of the pores of calcium-activated and voltage-gated potassium channels determined by a sea anemone toxin // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 31. P. 21885–21892. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.31.21885>
6. *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. V. 14. № 12. P. 229. <https://doi.org/10.3390/md14120229>
7. *Logashina Y.A., Mosharova I.V., Korolkova Y.V., et al.* Peptide from sea anemone *Metridium senile* affects transient receptor potential ankyrin-repeat 1 (TRPA1) function and produces analgesic effect // *J. Biol. Chem.* 2017. V. 292. № 7. P. 2992–3004. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.757369>
8. *Schweitz H., Bidard J., 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. V. 24. № 14. P. 3554–3561. <https://doi.org/10.1021/bi00335a025>
9. *Salgado V.L., Kem W.R.* Actions of three structurally distinct sea anemone toxins on crustacean and insect sodium channels // *Toxicol.* 1992. V. 30. № 11. P. 1365–1381. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(92\)90512-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(92)90512-4)
10. *Honma T., Kawahata S., Ishida M., et al.* Novel peptide toxins from the sea anemone *Stichodactyla haddoni* // *Peptides*. 2008. V. 29. № 4. P. 536–544. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.12.010>
11. *Зыкова Т.А., Винокуров Л.М., Козловская Э.П., и др.* Аминокислотная последовательность нейротоксина III из актинии *Radianthus macrodactylus* // *Биоорг. химия*. 1985. Т. 11. № 3. С. 302–310.
12. *Wilcox G.R., Fogh R.H., Norton R.S.* Refined structure in solution of the sea anemone neurotoxin ShI // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. № 33. P. 24707–24719.
13. *Pallaghy P.K., Scanlon M., Monks S., et al.* Three-dimensional structure in solution of the polypeptide cardiac stimulant anthopleurin-A // *Biochemistry*. 1995. V. 34. № 11. P. 3782–3794. <https://doi.org/10.1021/bi00011a036>
14. *Wullschleger B., Kuhn-Nentwig L., Tromp J., et al.* CSTX-13, a highly synergistically acting two-chain neurotoxic enhancer in the venom of the spider *Cupiennius salei* (Ctenidae) // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004. V. 101. № 31. P. 11251–11256. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402226101>

NEW SEA ANEMONE TOXIN RTX-VI SELECTIVELY MODULATES VOLTAGE-GATED SODIUM CHANNELS

R. S. Kalina^{a,#}, S. Peigneur^b, I. N. Gladkikh^a, P. S. Dmitrenok^a, N. Y. Kim^a, E. V. Leychenko^a,
M. M. Monastyrnaya^a, J. Tytgat^b, and E. P. Kozlovskaya^a

^a G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok, Russian Federation

^b Toxicology and Pharmacology, University of Leuven, Leuven, Belgium

[#]e-mail: kalinarimma@gmail.com

Presented by academician of the RAS V. A. Stonik

A new neurotoxin RTX-VI that modulates the voltage-gated sodium channels (Na_v) was isolated from the ethanolic extract of the sea anemone *Heteractis crispa*. Its amino acid sequence was determined by a combination of Edman degradation and tandem mass spectrometry. RTX-VI turned out to be an unusual natural analogue of previously described sea anemone toxin RTX-III. The molecule of RTX-VI consists of two disulfide-linked peptide chains and is devoid of Arg13, which is important for the selectivity and affinity of such peptides for the Na_v channels. Electrophysiological screening of RTX-VI on Na_v channel subtypes showed its selective interaction with the central nervous system (Na_v1.2, Na_v1.6) and insect (BgNa_v1, VdNa_v1) sodium channels.

Keywords: sea anemone, *Heteractis crispa*, voltage-gated sodium channels, toxins, electrophysiology