

УДК 577.1; 574.5; 615.3

© Коллектив авторов

## **КОНОТОКСИНЫ: ОТ БИОРАЗНООБРАЗИЯ БРЮХОНОГИХ МОЛЛЮСКОВ К РАЗРАБОТКЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

***А.Э. Федосов<sup>1,2\*</sup>, С.А. Мошковский<sup>3</sup>, К.Г. Кузнецова<sup>3,4</sup>, Б.М. Оливера<sup>2</sup>***

<sup>1</sup>Учреждение Российской академии наук Институт проблем экологии  
и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, 119071 Москва,  
Ленинский проспект, д. 33; факс: (495) 954-55-34;  
эл. почта: fedosov\_zool@mail.ru

<sup>2</sup>Биологический факультет, Университет Юты, США, Department of Biology,  
University of Utah, 257 South 1400 East, Rm. 201, Salt Lake City,  
UT 84112-0840; fax: 801-581-4668

<sup>3</sup>Учреждение Российской академии медицинских наук Институт  
биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича РАМН, 119121 Москва,  
Погодинская ул., д.10; факс: (499) 245-08-57;  
эл. почта: sergei.moshkovskii@ibmc.msk.ru

<sup>4</sup>Биологический факультет Московского государственного университета  
имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;  
факс: (495) 939-43-09

Обзор характеризует основные направления исследований конотоксинов – токсических соединений пептидной природы, происходящих из морских брюхоногих моллюсков рода *Conus*, со времени их открытия в 70-е годы XX века до наших дней. Рассматривается классификация конотоксинов, разнообразие их структуры и способов воздействия на мишени, в частности, на различные ионные каналы. В качестве особо значимого прикладного аспекта изучения конотоксинов обсуждается перспектива разработки на их основе лекарственных средств. Первым примером такого лекарства может служить обезболивающий препарат нового поколения – зиконотид.

**Ключевые слова:** конотоксин, конопептид, брюхоногий моллюск, ионный канал, лекарственное средство.

---

\* - адресат для переписки

**ВВЕДЕНИЕ.** Конотоксины представляют собой группу относительно коротких олигопептидов, содержащих большое число остатков цистеина, получаемых из яда хищных морских брюхоногих моллюсков рода *Conus*. Моллюски этой группы многочисленны в мелководных областях тропических областей Индийского и Тихого океанов и характеризуются исключительным таксономическим разнообразием: по современным данным, род *Conus* включает не менее 700 видов, будучи, вероятно, самым крупным родом беспозвоночных животных [1]. Исключительный эволюционный успех рода *Conus* объясняется уникальным методом охоты его представителей, в основе которого лежит использование секрета особой ядовитой железы для обездвиживания и умерщвления жертвы. Яд конуса представляет собой смесь, содержащую 50-200 индивидуальных олигопептидов, каждый из которых характеризуется специфическим физиологическим эффектом [2, 3].

Согласно некоторым оценкам [3, 4], природное разнообразие конотоксинов составляет около 50000-100000 индивидуальных олигопептидов. Значительную поправку в эту оценку может вносить перекрывание состава токсинов близких видов рода *Conus*. В то же время, применение более совершенных комплексных методик при анализе состава яда моллюсков рода *Conus* позволило предположить, что разнообразие индивидуальных токсинов в яде моллюсков рода *Conus* было недооценено по крайней мере в пять раз [5].

Первые конотоксины были выделены и охарактеризованы более тридцати лет назад [6, 7], и с тех пор число работ, посвященных им, растёт экспоненциально. Причина столь пристального внимания к конотоксинам – исключительная физиологическая активность, этих веществ, проявляющаяся при их введении в тело позвоночных и некоторых беспозвоночных животных.

Большинство известных токсинов конусов взаимодействуют с ионными каналами, влияя на распространение импульсов в нервной системе и нервно-мышечную передачу. Эта группа веществ сочетает исключительное разнообразие механизмов воздействия на ионные каналы позвоночных и беспозвоночных с высокой специфичностью действия каждого конкретного конотоксина. Это делает конотоксины ценным инструментом в изучении функционирования различных типов ионных каналов, позволяющим строго избирательно блокировать определенный их тип. Благодаря этому свойству конотоксины могут использоваться при исследованиях структуры и молекулярной кинетики ионных каналов, и их вклада в формирование и распространение потенциала действия и синаптическую передачу [8]. Так, использование  $\omega$ -конотоксина GVIA, антагониста потенциалзависимых кальциевых каналов, позволяющего эффективно блокировать синаптическую передачу, легло в основу многих исследований в области нейрофизиологии [2]. С другой стороны, высокая молекулярная специфичность и эффективность в малых дозах делает конотоксины перспективным ресурсом для фармакологии. К настоящему моменту один лекарственный препарат на основе конотоксина прошел клинические испытания и был рекомендован Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA), шесть препаратов проходят клинические испытания, и более 20 препаратов находятся на стадии доклинических лабораторных исследований [9-11].

## 1. КОНОТОКСИНЫ НА СЛУЖБЕ У МОЛЛЮСКОВ РОДА *CONUS*.

Моллюски рода *Conus* широко известны благодаря исключительно разнообразным раковинам, традиционно пользующимся большой популярностью у коллекционеров. Кроме того, эти моллюски характеризуются

сложными механизмами питания, позволившими им стать одной из немногих групп морских беспозвоночных, освоивших питание рыбой [12].

Моллюски относительно малоподвижны и ведут преимущественно ночной образ жизни. Приспособление к питанию активно-плавающими животными потребовало от предков конусов развития механизмов быстрой и эффективной инактивации жертвы. Появление такого механизма связано с развитием у предков конусов ядовитой железы, вырабатывающей целый “коктейль” нейротоксинов. Приспособление предков конусов к питанию подвижными животными сопровождалось специализацией и других органов переднего отдела пищеварительной системы [13]. Специализация связана, в первую очередь, со значительной модификацией ротового аппарата моллюска – радулы [14]. При атаке моллюска секрет ядовитой железы попадает в ткани жертвы, вызывая её паралич и, впоследствии, глубокое расслабление мышц, а, в некоторых случаях, смерть [7, 15].

В процессе эволюции представители рода *Conus* специализировались на питании разными объектами, на данный момент выделяют три основные группы видов по этому признаку: питающиеся червеобразными беспозвоночными, другими брюхоногими моллюсками и рыбами, соответственно [16]. Очевидно, что состав яда представителей этих трёх групп значительно различается. Однако, по-видимому, часть индивидуальных токсинов, содержащихся в яде конусов обладают универсальным действием. Как было показано, яд *C. textile*, специализирующегося на питании моллюсками, будучи введён в тело позвоночного вызывает значительный токсический эффект [17]. Вероятнее всего, это связано с вторичной функцией секретов ядовитой железы – защитной.

Ранее показано, что некоторые виды конусов могут быть опасны для человека [18]. Всего известно 3 вида рода *Conus*, контакт с которыми заканчивался летальным исходом (известно около 30 случаев), из них около 90% приходится на долю крупного рыбадного вида *C. geographus*. Именно это наблюдение вызвало первоначальный интерес к токсинам, вырабатываемым моллюсками рода *Conus* [19].

Род *Conus* относится к исключительно разнообразному и таксономически сложному надсемейству *Conoidea* [20], которое по современным оценкам насчитывает более 10000 видов, значительная часть которых остаются неописанными [21]. Соответственно, разнообразие рода *Conus* составляет менее 10% разнообразия *Conoidea*. Надсемейство *Conoidea* традиционно разделяется на три семейства: *Conidae* (конусы), *Terebridae*, и *Turridae*, причём последнее семейство включает более 90% представителей *Conoidea*. Все коноидеи имеют ядовитую железу, однако механизмы питания туррид изучены крайне слабо, а морфологические данные предполагают, что они схожи с механизмами питания конусов, хотя и менее эффективны. Данные по составу токсинов *Turridae* стали появляться только в последние несколько лет, и согласно предварительным исследованиям они имеют ряд значительных отличий от нейротоксинов конусов [22-24].

## 2. ХИМИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА И КЛАССИФИКАЦИЯ КОНОПЕПТИДОВ.

С химической точки зрения токсины конусов (в широком смысле – конопептиды) представляют собой олигопептиды длиной 12-46 аминокислотных остатков (а.о.), как правило, содержащие большое число остатков цистеина [25, 26]. Количество и порядок расположения остатков цистеина лежит в основе химической классификации конотоксинов (рисунок).

**КОНОПЕПТИДЫ**

- НЕ БОГАТЫЕ ЦИСТЕИНОМ**
  - без дисульфидных связей
    - Контулакин → Нейротензиновые рецепторы
    - Конантокин → NMDA рецепторы
    - Конорфамид → Rfamide рецепторы
  - C-C
    - Конопрессин → Вазопрессинные рецепторы
    - Контрифан → [?]
- БОГАТЫЕ ЦИСТЕИНОМ**
  - O**
    - C-C-CC-C-C → Na, K, Ca → δ, μO, κ, ω
  - M**
    - CC-C-C-CC → Na, nACh, K → μ, ψ, κM
  - A**
    - CC-C-C → nACh → α
    - CC-C-C-C-C → nACh → αA
    - K → κA
  - S**
    - C-C-C-C-C-G-G-C-C-C-C → 5-HT<sub>3</sub> → σ
  - T**
    - CC-CC → [?] → χ
    - CC-CPC → NE-Transporter
  - P**
    - C-C-C-C-C-C → [?]
  - I**
    - C-C-CC-CC-C-C → K

**Семейство**

**Молекулярная мишень**

**Надсемейство**

**Cys-скелет**

**Молекулярная мишень**

**Семейство**

Большинство известных конотоксинов относится к группе богатых дисульфидными связями пептидов (именно эту группу традиционно называют конотоксинами) и характеризуются наличием в молекуле 4-8 остатков цистеина, разделенных 0-6 остатками других аминокислот. Остатки цистеина образуют многочисленные дисульфидные связи, которые определяют конформацию олигопептида. Порядок расположения остатков цистеина в молекуле конотоксина задает специфический паттерн дисульфидных связей, так что конотоксины, имеющие одинаковое распределение остатков цистеина в молекуле, имеют сходные конформации. Поэтому зная порядок расположения остатков цистеина в молекуле конотоксина, как правило, можно предсказать её конформацию, и, в большинстве случаев, физиологическую активность. Таким образом, порядок расположения остатков цистеина в первичной структуре конотоксинов был положен в основу разделения семейств богатых цистеином конотоксинов [27].

270

Конопептиды, относящиеся к другой крупной группе – не богатые дисульфидными связями – может содержать пару остатков цистеина, образующих одну дисульфидную связь или не иметь дисульфидных связей вовсе [2]. В плане разнообразия и физиологической активности эти токсины изучены существенно слабее конотоксинов. Показано, что не богатые дисульфидными связями конопептиды, в основном, взаимодействуют с лиганд-зависимыми ионными каналами, хотя для некоторых из них доказаны весьма необычные физиологические эффекты [34].

### 3. ЭКСПРЕССИЯ КОНОПЕПТИДОВ.

Изучение особенностей биосинтеза конотоксинов в эпителиальных клетках ядовитой железы моллюсков рода *Conus* показало, что все конотоксины синтезируются на рибосомах в ходе трансляции с соответствующих мРНК. В результате трансляции образуется белковый предшественник, имеющий общую организацию у всех конотоксинов. С открытой рамки считывания N-конца предшественника располагается сигнальный “pre”-участок, за которым следует промежуточный “pro”-фрагмент, за которым, на C-конце предшественника располагается последовательность, соответствующая зрелому токсину, представленная всегда одной копией. Все конотоксины при созревании проходят стадию протеолитического расщепления предшественника с удалением “pre”- и “pro”-участков [2, 27].

Сравнение структуры предшественников различных конотоксинов показало, что конотоксины, принадлежащие к близким семействам (т.е., имеющие сходный Cys-паттерн), имеют также общий, высоко консервативный “pre”-участок [2]. На основании этого факта семейства близких по строению токсинов, имеющих общую сигнальную последовательность, стали объединять в надсемейства. Таким образом, в предшественнике с консервативными участками соседствуют участки повышенной вариабельности (собственно последовательность токсина). Как было показано, при изучении кДНК клонов мРНК конотоксинов даже третья позиция кодонов в участках мРНК, соответствующих “pre”-фрагменту, крайне консервативна [28].

Механизмы посттрансляционной модификации аминокислот активно исследуются, наиболее полные данные получены для  $\gamma$ -карбокси-глутамата [35, 36]. Фермент, обеспечивающий модификацию глутамата, экспрессируется в ядовитой железе моллюска и специфически связывается с последовательностью, расположенной в “pre”-участке предшественника. При этом фермент, видимо, меняет конформацию, что обеспечивает специфичное взаимодействие с остатком глутамата с его модификацией [29].

Количество копий генов, кодирующих конотоксины и их локализация в геноме на данный момент не известны, однако, этот аспект активно изучается. В настоящее время ведутся работы по расшифровке полных геномов *C. bullatus* и *C. consors* [Р.К. Vandyopadhyay, N. Puillandre, личные сообщения]; результаты этих работ должны пролить свет и на вопросы организации генов, кодирующих конотоксины. Исследование эволюции генов, кодирующих конотоксины  $\delta$ -семейства [37] и I-надсемейства [27], позволили выявить не менее четырёх механизмов, лежащих в основе преобразований этих генов: специализация, дупликация, рекомбинация и фокальная гипермутация. Множественные генные дупликации с последующей быстрой дивергенцией отдельных генов привели к формированию большого разнообразия индивидуальных токсинов у каждого вида рода *Conus*. По некоторым данным [38], в яде некоторых видов рода *Conus* может присутствовать не менее 15 токсинов  $\delta$ -семейства, различия в первичной структуре которых могут существенно превосходить различия



между гомологичными токсинами близкородственных видов. Согласно более современным неопубликованным данным [N. Puillandre, личное сообщение], число индивидуальных конотоксинов только А-надсемейства у одного экземпляра *Copis* может достигать двухсот.

Исследование экспрессии пяти надсемейств конотоксинов *C. textile* в разных участках ядовитой железы показало, что картина экспрессии значительно различается между дистальным, медиальным и проксимальным участками ядовитой железы [3]. Конопептиды надсемейств А, М, Р и Т экспрессируются преимущественно в проксимальной половине – двух третях ядовитой железы, тогда как в клетках дистальной четверти железы концентрация мРНК, соответствующей этим токсинам, значительно ниже. Единственное исключение – конотоксины надсемейства О, которые экспрессируются по всей длине ядовитой железы, но наибольшая концентрация их мРНК обнаружена в дистальной части ядовитой железы. Наиболее характерные пики, полученные при ВЭЖХ яда *C. textile*, соответствуют группе  $\mu$ -конотоксинов, продуцируемых в проксимальной половине ядовитой железы, и  $\delta$ -конотоксина TxVIA, интенсивный пик которого присутствует в медиальной части железы [3].

Дополнительно была исследована картина экспрессии протеиндисульфидизомеразы (PDI) – основного фермента, ответственного за образование дисульфидных связей, задающих конформацию молекулы конотоксина. Было показано, что во всех участках ядовитой железы *C. textile* этот фермент экспрессируется с одинаково высокой интенсивностью [3].

### 4. КОНОПЕПТИДЫ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИЕ

#### С ПОТЕНЦИАЛЗАВИСИМЫМИ ИОННЫМИ КАНАЛАМИ.

*4.1. Структура потенциалзависимых ионных каналов и разнообразие их блокаторов.*

Потенциалзависимые ионные каналы представляют собой большую группу сходных по структуре мембранных белков, активируемых при изменении мембранного потенциала [39, 40]. Эти белки характеризуются избирательной проницаемостью для ионов калия, натрия или кальция и выполняют основную роль в генерировании и передаче потенциала действия. Пора потенциалзависимых ионных каналов образована трансмембранной  $\alpha$ -субъединицей, состоящей из четырёх структурно гомологичных доменов (Na- и Ca-каналы) или из четырёх отдельных субъединиц, одинакового или различного строения (K-каналы). В основе активации потенциалзависимого ионного канала лежит изменение конформации комплекса белков канала, обеспечивающая его избирательную ионную проницаемость. При дальнейших изменениях конформации канал может возвращаться в свое первоначальное закрытое состояние, либо быть временно инактивирован, принимая третью возможную конформацию [40, 41].

Токсины, блокирующие потенциалзависимые ионные каналы, широко распространены в природе. В данном разделе мы рассматриваем свойства конотоксинов, взаимодействующих с  $\alpha$ -субъединицей Na-, K- и Ca-каналов.

Конотоксины, связывающиеся с натриевыми каналами, относятся к трём различным семействам:  $\mu$ -конотоксины (блокаторы натриевых каналов),  $\mu$ O-конотоксины (ингибиторы проницаемости Na-каналов – см. далее) и  $\delta$ -конотоксины (действие этих токсинов замедляет или блокирует быструю инактивацию Na-каналов) [2, 42]. Антагонисты кальциевых каналов широко известны по  $\omega$ -конотоксину GVIA.  $\omega$ -Конотоксины блокируют синаптическую нервно-мышечную передачу, с чем связано их активное применение в нейрофизиологии [42, 43]. Блокаторы калиевых каналов, k- и kM-конотоксины,

характеризуются исключительным разнообразием структуры и на настоящий момент остаются слабо изучены. Молекулярная мишень большинства токсинов этой группы на данный момент не известна. Любопытно, что если конотоксины, взаимодействующие с натриевыми каналами, весьма консервативны, то конотоксины - антагонисты калиевых каналов крайне разнообразны по структуре и генетически у разных таксономических групп рода *Conus* [2].

Физиологическое действие конотоксинов, взаимодействующих с потенциалзависимыми ионными каналами, крайне разнообразно.  $\mu$ -Конотоксины рыбоядных видов рода *Conus*, взаимодействующие с натриевыми каналами мышечного типа и  $\omega$ -конотоксины, блокирующие пресинаптические кальциевые каналы, обеспечивают обширный паралич жертвы, вызывая необратимое нарушение нервно-мышечной передачи [44]. В то же время, некоторые  $\delta$ -конотоксины могут выполнять и защитную функцию: как было показано, их введение в ткани позвоночных животных вызывают интенсивную боль [44].

#### 4.2. Конотоксины-антагонисты $Na^+$ каналов.

Потенциалзависимые натриевые каналы – ключевые белки, участвующие в генерации и проведении нервного импульса. Активация натриевых каналов в ответ на изменение трансмембранного потенциала лежит в основе формирования потенциала действия в электровозбудимых тканях. На данный момент известно 10 изоформ  $\alpha$ -субъединицы, определяющих функционирование натриевых каналов; для их систематизации была предложена унифицированная номенклатура (Nav1.x) [45-47]. Кроме того, натриевые каналы были условно разделены на две группы по чувствительности к тетродотоксину (TTX): TTX-чувствительные и TTX-устойчивые. Сайт связывания TTX названный сайтом I, взаимодействует также и с другими токсинами, например, с сакситоксином (STX) [48]. Всего выявлено не менее пяти сайтов, отличных от сайта I, обеспечивающих специфическое взаимодействие белкового комплекса ионного канала, с различными физиологически-активными лигандами [49, 50].

4.2.1.  $\mu$ -Конотоксины.  $\mu$ -Конотоксины относятся к М-надсемейству конотоксинов; они впервые были получены из яда рыбоядного *C. geographus* [51]. Эти олигопептиды, состоящие из 22-25 аминокислотных остатков, содержат 6 остатков цистеина, образующих Cys-паттерн III (см. рисунок).  $\mu$ -Конотоксины блокируют ток ионов натрия в клетку, взаимодействуя с сайтом I (сайтом связывания TTX) натриевых каналов. На данный момент  $\mu$ -конотоксины – единственные известные лиганды пептидной природы, взаимодействующие с этим участком натриевых каналов [2].

На данный момент лучше всего охарактеризованы  $\mu$ -конотоксины GIIIA и GIIIB, выделенные из яда *C. geographus*. Эти токсины избирательно блокируют натриевые каналы скелетных мышц (Nav1.4) и обладают существенно меньшим сродством к натриевым каналам других типов [52, 53]. Структурно-функциональные исследования показали сложный характер взаимодействия GIIIA и GIIIB с порой натриевого канала, в котором участвуют несколько аминокислотных остатков конотоксина. Как было показано, участок связывания GIIIA и GIIIB перекрывается с участком связывания TTX, но не идентичен ему [54, 55]. Некоторые точечные мутации, которые ведут к значительному изменению чувствительности Nav1.4 к TTX, лишь незначительно влияют на значение концентрации GIIIA и GIIIB, вызывающей 50% от максимального эффекта ингибирования ( $IC_{50}$ ) [56].

Многочисленные исследования в области молекулярного моделирования позволили предложить подробный механизм взаимодействия молекул GIIIA с комплексом ионного канала [57]. Ключевая роль в блокировании поры

## КОНОТОКСИНЫ

ионного канала конотоксином принадлежит остатку Arg-13, который, судя по всему, выполняет роль стерического и электростатического барьера, перекрывающего пору натриевого канала [53, 55, 57, 58]. Аминокислотные замены указанного остатка позволили получить аналоги GIIIA и GIIIB, которые лишь частично блокируют проводимость Nav1.4, скорее всего из-за неполного физического перекрывания поры натриевых каналов. Использование подобных аналогов позволило изучить взаимодействие прочих аминокислот конотоксина с белковым комплексом канала [59].

Другой относительно полно характеризованный  $\mu$ -конотоксин – RPIIA, выделенный из секрета ядовитой железы *Conus purpurascens*. Этот олигопептид также содержит остаток аргинина (Arg-14), функционально гомологичный Arg-13  $\mu$ -GPIIA. Исследования специфичности действия RPIIA на рекомбинантные натриевые каналы млекопитающих показали, что, обладая наибольшим сродством к Nav1.4 каналам, в субмикромольных концентрациях RPIIA блокирует также и Nav1.2 каналы нейронов [60]. Это свойство отличает его от  $\mu$ -конотоксинов GPIIA и GIIIB.

Исследование молекулярного строения RPIIA показало, что в растворах этот олигопептид может принимать две альтернативные конформации, соответствующие *цис*- и *транс*- конформациям гидроксипролина-8 [61]. Трехмерная структура RPIIA при *транс*-конформации гидроксипролина-8 значительно отличается от структур GPIIA и GIIIB, что может определять различия во взаимодействии с натриевыми каналами.

Ещё более универсальное действие на ТТХ-чувствительные натриевые каналы характерно для недавно описанного  $\mu$ -конотоксина KPIIA [62]. Тестирование на периферических нейронах мыши показало, что этот токсин необратимо ингибирует 80% ТТХ-чувствительных каналов и лишь 20% ТТХ-устойчивых. Введение микромольных количеств этого токсина мыши снижает болевые эффекты, вызываемые последующей инъекцией формалина.

Относительно недавно был выделен новый  $\mu$ -конотоксин SmPIIA (*C. stercusmuscarum*), обладающий значительной специфичностью взаимодействия с потенциалзависимыми натриевыми каналами нейронов. Уникальной особенностью SmPIIA является то, что этот конотоксин необратимо ингибирует большинство ТТХ устойчивых потенциалзависимых натриевых каналов в диссоциированных нейронах симпатических и дорзальных стволовых (dorsal root) ганглиев лягушки [60]. В то же время SmPIIA никак не влияет на функционирование ТТХ чувствительных натриевых каналов этих нейронов. Несмотря на то, что действие этого нового  $\mu$ -конотоксина на системы ионных каналов млекопитающих неизвестно, сродство к ТТХ устойчивым каналам значительно отличает его от всех характеризованных ранее  $\mu$ -конотоксинов.

Всего на данный момент известно не менее 7  $\mu$ -конотоксинов, ингибирующих ТТХ устойчивые натриевые каналы амфибий [63], и не менее двух, взаимодействующих на ТТХ устойчивые натриевые каналы млекопитающих [64].

**4.2.2.  $\mu$ О-Конотоксины и  $\delta$ -конотоксины.** Как  $\mu$ О-, так и  $\delta$ -конотоксины представляют собой гидрофобные олигопептиды, принадлежащие к О-надсемейству (см. рисунок).  $\mu$ О-конотоксины, как и  $\mu$ -конотоксины ингибируют проницаемость натриевых каналов, но, скорее всего в основе их физиологического эффекта лежит принципиально иной молекулярный механизм. Было показано, что в отличие от последних,  $\mu$ О-конотоксины не конкурируют с сакситоцином при взаимодействии с белковым комплексом ионного канала, соответственно, не связываются с сайтом I [48, 65]. Однако,



точный механизм взаимодействия  $\mu$ O-конотоксинов с натриевыми каналами пока не известен. Два близких токсина,  $\mu$ O-MrVIA и  $\mu$ O-MrVIB, содержащие по 31 а.о., получены из яда моллюскоядного *Conus marmoreus*. Эти два токсина примечательны тем, что имеют Cys-паттерн, напоминающий скорее  $\omega$ -конотоксины, чем  $\mu$ -конотоксины.

$\mu$ O-Конотоксины  $\mu$ O-MrVIA и  $\mu$ O-MrVIB способны ингибировать потенциалзависимые натриевые каналы нейронов моллюсков, амфибий [66] и млекопитающих [44, 66-70]. Эти токсины ингибируют ТТХ-устойчивые натриевые каналы Nav1.8 нейронов крысы значительно эффективнее, чем ТТХ-чувствительные [67, 68]. Более того,  $\mu$ O-MrVIB эффективно ингибирует ТТХ-устойчивые Nav1.8 каналы нейронов человека, при этом не оказывая эффекта на функционирование ТТХ-устойчивых Nav1.9 каналов [68].  $\mu$ O-MrVIB также ингибирует потенциалзависимые натриевые каналы Nav1.2 и Nav1.4 типов, проявляя большее сродство к каналам второго типа [71]. Точный механизм взаимодействия  $\mu$ O-MrVIA и  $\mu$ O-MrVIB с белковым комплексом канала пока не ясен, однако существующие данные позволяют предположить, что молекулы токсинов связываются с С-терминальной петлей III домена  $\alpha$ -субъединицы натриевого канала [44, 71].

$\delta$ -Конотоксины имеют такой же Cys-паттерн, что и  $\mu$ O- и  $\omega$ -конотоксины и также принадлежат к O-надсемейству. Основной эффект конотоксинов  $\delta$ -семейства – ингибирование быстрой инактивации потенциалзависимых натриевых каналов, одного из основных механизмов определения формы и длительности потенциала действия [44]. Инактивация этих каналов приводит к пролонгации потенциала действия, деполяризации клеточной мембраны и в конечном итоге к массовому электрическому перевозбуждению всей нервной системы. Молекулярный механизм взаимодействия  $\delta$ -конотоксинов с комплексом белков ионного канала активно исследуется; предполагается, что связывание молекулы  $\delta$ -конотоксина с внеклеточной стороной ионного канала приводит к изменению конформации его внутриклеточного домена, отвечающего за инактивацию канала [2].

Наблюдаемые эффекты  $\delta$ -конотоксинов в значительной степени зависят от системы тестирования. Конотоксин  $\delta$ -TxVIA, полученный из яда моллюскоядного *C. textile*, пролонгирует ток ионов натрия через мембраны нейронов моллюсков. В системах позвоночных этот токсин связывается с натриевыми каналами, однако, токсического действия не оказывает [72]. Другой представитель этой группы,  $\delta$ -PVIA, выделенный из ядовитой железы *C. purpurascens*, охотящегося на рыб, вызывает явные признаки перевозбуждения нервной системы при введении в тело рыбы или мыши, но не оказывает никакого эффекта на моллюсков, даже при дозировке, в 100 раз превышающей эффективную для рыбы. Конотоксины  $\delta$ -PVIA и  $\delta$ -SVIE ингибируют потенциалзависимые натриевые каналы млекопитающих [73]. Другой  $\delta$ -конотоксин EVIA, препятствует инактивации натриевых каналов типов Nav1.2, Nav1.3 и Nav1.6 нейронов крысы, но в то же время не взаимодействует с каналами мышечного типа Nav1.4 крысы и также не оказывает воздействия на потенциалзависимые натриевые каналы Nav1.5 сердечной мышцы человека [74]. Интересно, что конотоксины  $\delta$ -PVIA и  $\delta$ -GmVIA могут блокировать Nav1.2 и Nav1.4 натриевые каналы, экспрессируемые в ооцитах *Xenopus* [70], при этом их механизм взаимодействия с белковыми комплексами каналов близок к механизму взаимодействия  $\mu$ O-конотоксинов [44, 71].

Недавние исследования физиологической активности конотоксинов I-надсемейства [75, 76], выделенных из рыбадного *C. radiatus*, показали

## КОНОТОКСИНЫ

высокое сродство токсинов этой группы (а именно, iRXIA) к каналам типа Nav1.6. Также было выявлено [77], что ключевую роль при взаимодействии 46-членного олигопептида iRXIA с натриевым каналом играет модифицированный остаток D-Phe-44. Конотоксин iRXIA выделенный из ядовитой железы *C. radiatus* и его искусственно синтезированный аналог продемонстрировали одинаковый эффект – генерацию повторяющихся потенциалов действия на мембранах испытываемых нервных клеток. Тестирование искусственного аналога iRXIA, содержащего L-Phe-44, не вызвало электрофизиологической активности тестируемых клеток даже при использовании концентрации этого аналога в 10-20 раз превышающей действующую концентрацию iRXIA [4].

### 4.3. Конотоксины - антагонисты $K^+$ каналов.

Калиевые каналы играют важнейшую физиологическую роль, обеспечивая реполяризацию мембраны после потенциала действия, а также выполняют множество других функций в клетках самых разных типов [78]. В соответствии с широким спектром физиологических функций, выделяют несколько семейств потенциалзависимых калиевых каналов (Kv1.x, Kv2.x и т.д.), белки которых кодируются более чем 80 генами.  $\alpha$ -Субъединица потенциалзависимого калиевого канала состоит из шести трансмембранных доменов; функциональный белковый комплекс, образующий пору канала, может быть гомомерным или гетеромерным [79]. Первые конотоксины, взаимодействующие с калиевыми каналами, были обнаружены и охарактеризованы в 1996 году [80], и на данный момент незначительное их число изучено подробно. Исследование молекулярных механизмов взаимодействия конотоксинов, связывающихся с гетеромерными K-каналами, требует значительных усилий: из-за сложной структуры канала затруднительно точно определить молекулярную мишень конотоксина [25].

Недавние исследования показали, что разные таксономические группы конусов выделяют несколько отдельных семейств токсинов, взаимодействующих с калиевыми ионными каналами [81, 82], однако, точный физиологический эффект и молекулярная специфичность большинства из них, особенно, в системах экспрессии млекопитающих, остаются недостаточно изученными.

**4.3.1. к-Конотоксины.** Первый конотоксин, для которого было показано активное взаимодействие с потенциалзависимыми калиевыми каналами, к-конотоксин PVIIA, был получен из яда рыбоядного конуса *C. purpurascence* [60, 80]. Исследование на калиевых каналах дрозофилы Shaker [83], клонированных в ооцитах *Xenopus*, показало, что к-PVIIA с высокой эффективностью ( $IC_{50}$  50 нМ) блокирует ток калия через эти каналы [2]. При этом тестируемые каналы Shaker, очевидно, не являлись естественной молекулярной мишенью PVIIA. До настоящего момента такая мишень не была установлена. Введение к-PVIIA вызывает симптомы возбуждения у мыши, но на данный момент из более чем 20 типов клонированных калиевых каналов млекопитающих ни для одного не было отмечено высоко специфического взаимодействия с этим конотоксином. Тем не менее, было показано, что кМ-конотоксин RPIK способен блокировать Kv1.2 мыши [84]. Также для этого олигопептида был показан кардиопротекторный эффект при тестировании модели ишемии у мыши [85, 86].

Очевидно, блокирование калиевых каналов конотоксином к-PVIIA играет важную роль в охоте рыбоядных конусов: как было показано, к-PVIIA играет ключевую роль в быстром обездвиживании жертвы [2]. Физиологически к-PVIIA действует синергично с  $\delta$ -конотоксином PVIA, приводя к общему

перевозбуждению мембран электрочувствительных клеток всего организма жертвы и её почти мгновенному тетаническому параличу [25].

Взаимодействие конотоксина к-PVIIA с комплексом белков калиевого канала носит бимолекулярный характер. Анализ каналов Shaker, блокируемых к-PVIIA, показал, что молекула конотоксина связывается с внешней стороной поры канала. Искусственно полученные каналы Shaker, несущие мутацию в Р-петле, имели существенно меньшее сродство к конотоксину к-PVIIA [60]. Дальнейшие исследования показали, что к-PVIIA, как и другие антагонисты калиевых каналов, содержит характерный аминокислотный мотив (Lys-7 и Phe-9), играющий ключевую роль при блокировании каналов [87].

Эти данные поддерживают “модель критической диады”, предложенную [88, 89] для антагонистов калиевых каналов белковой природы. По первичной структуре к-PVIIA не имеет значительной гомологии с белковыми антагонистами К-каналов других ядовитых животных. По-видимому, их общие функциональные элементы, обеспечивающие взаимодействие с ионными каналами, развились конвергентно. Таким образом, разные белковые антагонисты калиевых каналов с общим ключевым аминокислотным мотивом, выделенные из разных групп ядовитых животных, могут иметь одинаковые или очень схожие механизмы взаимодействия с ионными каналами вне зависимости от цистеинового скелета.

**4.3.2. кА- и кМ-конотоксины.** кА- и кМ-конотоксины значительно различаются по строению. кА-Конотоксины представляют собой О-гликозилированные олигопептиды, относящиеся к А-надсемейству [25], тогда как кМ-конотоксины относятся к М-надсемейству и по паттерну дисульфидных связей близки к  $\mu$ -конотоксинам [81].

Первый представитель кА-конотоксинов, кА-SIVA, был выделен из яда рыбоядного *C. striatus*. Введение этого конотоксина мышам вызывает у неё симптомы судорожного паралича [30]. Тестирование электрофизиологического эффекта кА-SIVA показало, что этот токсин вызывает повторяющиеся возбуждения в *Musculus cutaneous pectoris* и нейронах симпатического ганглия мозга лягушки. В микромолярных концентрациях кА-SIVA блокирует калиевые каналы Shaker, экспрессируемые в ооцитах *Xenopus*. Однако, молекулярные механизмы, лежащие в основе высокого сродства кА-SIVA к калиевым каналам позвоночных остаются неизвестными. Интересно, что кА-SIVA содержит О-гликозилированный серин-7; кА-конотоксины – единственные из всех исследованных на данный момент конопептидов, характеризуются посттрансляционным О-гликозилированием [30].

Исследования другого конотоксина, СсТх, выделенного из *C. consors*, имеющего общий Cys-паттерн с кА-SIVA, позволили предположить, что этот олигопептид активизирует потенциалзависимые натриевые каналы клеток, находящихся в состоянии покоя [90]. Если эти данные будут подтверждены, можно будет с уверенностью утверждать, что сходные по строению конотоксины могут иметь разные молекулярные механизмы действия.

Конотоксины, принадлежащие к недавно обнаруженному кМ-семейству, имеют тот же цистеиновый паттерн, что  $\mu$ -конотоксины и  $\psi$ -конотоксины, но демонстрируют другую молекулярную специфичность, обнаруживая высокое сродство к потенциалзависимым калиевым каналам [81]. Первый охарактеризованный токсин этой группы кМ-RIIIC выделен из ядовитой железы *C. radiatus*. В отличие от структурно близких  $\mu$ -конотоксинов, кМ-RIIIC не взаимодействует с Na-каналами, экспрессируемыми в ооцитах *Xenopus*, однако эффективно блокирует К-каналы Shaker (IC<sub>50</sub> 1 мкМ)

в той же системе экспрессии и проявляет даже большее сродство к K-каналам форели TShal ( $IC_{50}$  20 нМ) [25].

Взаимодействие конотоксина с порой канала носит бимолекулярный характер. Мутация с заменой аминокислотных остатков белкового комплекса, образующего пору канала Shaker, как и в случае к-PVIIA, значительно снижает сродство кМ-RIIIK к каналу. При этом кМ-RIIIK не содержит остатков фенилаланина или тирозина, формирующих “критическую диаду”, ответственную за взаимодействие токсина с калиевым каналом. Структурный анализ кМ-RIIIK показал, что молекула этого токсина взаимодействует с “преддверием” Shaker-канала и по механизму действия ближе к  $\mu$ -GPIA, чем к к-PVIIA [91].

Помимо рассмотренных выше, существует ещё как минимум три семейства конотоксинов, антагонистов потенциалзависимых калиевых каналов, причем все они структурно значительно отличаются от конотоксинов, рассмотренных выше [82]. Наиболее примечательны из них токсины, относящиеся к I-суперсемейству. Представители этой группы способны блокировать как  $K^+$ , так и  $Ca^{2+}$  потенциалзависимые каналы [25]. Изучение молекулярной специфичности токсина ViTx, относящегося к I-суперсемейству показало, что он специфически блокирует Kv1.1 и Kv1.3 каналы млекопитающих, однако, не взаимодействует с каналами Kv1.2 подтипа [92].

Также специфичные взаимодействия с потенциалзависимыми калиевыми каналами млекопитающих были продемонстрированы для токсина O-суперсемейства, изолированного из яда *C. monile*. Этот токсин способен ингибировать все калиевые каналы дорзального корешкового ганглия нейронов крысы [93].

#### 4.4. $\omega$ -Конотоксины-антагонисты $Ca^{2+}$ каналов.

Потенциалзависимые кальциевые каналы, обеспечивающие ток ионов  $Ca^{2+}$  в клетку в ответ на деполяризацию клеточной мембраны, участвуют во множестве сигнальных механизмов живых организмов, в частности, играют важную роль в нервно-мышечной передаче [94]. Кальциевые каналы представляют собой гетеромерные белковые комплексы, при этом физиологическая активность канала определяется в основном свойствами трансмембранной субъединицы  $\alpha 1$ , образующей пору канала [95].

На основании различий фармакологических и физиологических свойств, потенциалзависимые кальциевые каналы разделены на L-, N-, P-, Q-, R- и T-типы [96]. Позднее к ним была применена стандартная номенклатура, изначально разработанная для K-каналов. Cav1 семейство каналов соответствует L-типу, Cav2 семейство включает каналы P/Q типа, N-типа и R-типа, наконец, к семейству Cav3 относятся каналы T-типа [97].

Конотоксины - антагонисты Ca-каналов, большинство которых относятся к  $\omega$ -семейству, были в числе первых охарактеризованных конотоксинов. Именно они наиболее интенсивно используются в нейрофизиологических исследованиях. Применение  $\omega$ -конотоксинов позволило избирательно ингибировать кальциевые каналы определенного типа при изучении молекулярных механизмов синаптической передачи. Как и в случае с другими хорошо изученными группами конотоксинов, среди  $\omega$ -конотоксинов лучше всего характеризованы олигопептиды, выделенные из рыбоядных видов *Conus* [25]. При этом, согласно предварительным исследованиям, конусы, питающиеся моллюсками и полихетами, имеют не менее разнообразный набор конопептидов, специфически взаимодействующих с Ca-каналами. Так, были описаны конотоксины, избирательно блокирующие Ca-каналы



моллюсков, фармакологически соответствующие L-типу кальциевых каналов млекопитающих [72].

Секрет ядовитой железы рыбоядных видов рода *Conus* обычно содержит целый набор индивидуальных  $\omega$ -конотоксинов, значительно различающихся по первичной структуре и, скорее всего, специфичных в отношении разных типов Са-каналов. Это было продемонстрировано для яда *C. magus*. Из всего разнообразия  $\omega$ -конотоксинов этого моллюска были протестированы MVIIA и MVIIIC. Первый из них специфически взаимодействует с кальциевыми каналами N-типа (Cav2.2), тогда как второй предпочтительно блокирует каналы P/Q типов (Cav2.1). При этом значительный вклад во взаимодействие с белковым комплексом Са-каналов обоих типов вносит Trp-13, присутствующий как в MVIIA, так и в MVIIIC, меньший вклад вносит Lys-2 [98, 99].

Структурные исследования показали, что в первичной структуре  $\omega$ -конотоксинов высоко содержание основных аминокислотных остатков, которые, как известно, играют важную роль в ингибировании Са-каналов [100].

Конотоксин  $\omega$ -TxVII содержит функционально-важные остатки Phe-11 и Trp-26 и, в целом этот токсин значительно гидрофобнее большинства известных щ-конотоксинов. Возможно, он взаимодействует с теми же сайтами на поверхности кальциевых каналов, что и некоторые ингибиторы, обладающие существенно меньшей молекулярной массой, например, дегидропиридины и фенилалкиламины [101].

Согласно некоторым данным, токсины, не относящиеся к  $\omega$ -конотоксинам, например, Gla-содержащий контрифан, также способен ингибировать кальциевые каналы, что было показано на каналах L-типа млекопитающих [102].

## **5. КОНОПЕПТИДЫ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИЕ С ЛИГАНДЗАВИСИМЫМИ ИОННЫМИ КАНАЛАМИ.**

*5.1. Строение и разнообразие лигандзависимых ионных каналов и разнообразие их блокаторов.*

Лигандзависимые ионные каналы, постсинаптических мембран играют ключевую роль в передаче нервного импульса. Одна крупная группа объединяет лигандзависимые ионные каналы, активируемые ацетилхолином, серотонином, GABA и глицином. Все эти каналы структурно схожи – функциональный белковый комплекс канала образован пятью субъединицами, каждая из которых содержит четыре трансмембранные  $\alpha$ -спирали [103]. Другая крупная группа лигандзависимых ионных каналов – глутамат-зависимые, обычно разделяются на N-метил-D-аспартатные (NMDA) и каинатные (non-NMDA, AMPA) рецепторы. Наконец, третье семейство лигандзависимых ионных каналов, задействованных в некоторых синапсах – АТР-зависимые [104].

На данный момент известны конопептиды, взаимодействующие с ионными каналами всех трёх групп. Большинство из них взаимодействует с ионными каналами первой группы – эти токсины один из основных компонентов яда моллюсков рода *Conus*. Наиболее разнообразны и хорошо изучены токсины, взаимодействующие с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами [105, 106]. Особенно хорошо представлены в яде конусов конкурентные агонисты никотина, хотя также были обнаружены и неконкурентные. Необычную группу конопептидов составляют конантоксины, которые являются ингибиторами глутаматных NMDA-рецепторов. Эти белки характеризуются отсутствием “дисульфидного скелета” и большим содержанием остатков  $\gamma$ -карбоксиглутамата [35].

Очевидно общий физиологический эффект конотоксинов, ингибирующих постсинаптические рецепторы, заключается в нарушении нервно-мышечной передачи и, в конечном итоге, приводит к параличу жертвы [107]. По этому

## КОНОТОКСИНЫ

механизму действуют все ингибиторы никотиновых ацетилхолиновых рецепторов нервно-мышечного типа (nAChR), количественно доминирующие в яде рыбоядных видов рода *Conus*. Физиологический эффект конотоксинов, воздействующих на никотин-чувствительные ацетилхолиновые рецепторы других типов существенно менее ясен. Вероятно, их воздействие в комплексе с воздействием других конотоксинов подавляет защитные рефлексы жертвы [108].

Другой комплексный эффект был предложен для конотоксинов, антагонистов глутаматзависимых и 5-гидрокситриптамиин(5-НТЗ)-зависимых рецепторов. Первичные исследования физиологических эффектов этих токсинов позволили предположить, что они частично блокируют активность чувствительных нейронов, погружая жертву в состояние, сравнимое с “нирваной” [109].

**5.1.1.  $\alpha$ -Конотоксины и nAChRc.** Согласно современным представлениям о структуре никотин-чувствительных ацетилхолиновых ионных каналов, они представляют собой сложные белковые комплексы, включающие пять трансмембранных субъединиц [103]. У беспозвоночных большинство рецепторов этого типа, имеют гомомерное строение – все пять субъединиц структурно одинаковые, такое же строение имеют некоторые nAChRc рецепторы позвоночных (подтипы  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 9$ ). Однако, большинство nAChRc позвоночных гетеромерны, обычно они состоят из двух  $\alpha$ -субъединиц и трёх субъединиц иной структуры. Каждый рецептор имеет два сайта связывания ацетилхолина, располагающихся на границе  $\alpha$ -субъединиц с соседними субъединицами канала. Для перехода канала из закрытого состояния в открытое необходимо взаимодействие двух молекул ацетилхолина с обоими сайтами связывания на nAChRc [110, 111].

В природе существует значительное количество токсинов, конкурентно ингибирующих сайты связывания ацетилхолина, в частности к ним относятся такие широко известные нейротоксины, как  $\alpha$ -бунгаротоксин или алкалоид кураре [112]. Применение этих токсинов позволило исследовать строение и функционирование мышечного подтипа nAChRc, однако, изучение других типов nAChRc во многом стало возможно после открытия разнообразных узкоспецифичных  $\alpha$ -конотоксинов [113].

У млекопитающих одна из субъединиц никотин-чувствительного ионного канала, контактирующая с  $\alpha$ -субъединицей, замещается в процессе его формирования:  $\gamma$ -субъединица фетального рецептора замещается  $\varepsilon$ -субъединицей зрелого [114]. Соответственно, один из сайтов связывания ацетилхолина, располагающийся на границе субъединиц  $\alpha/\gamma$  -  $\alpha/\varepsilon$  также претерпевает структурные изменения. Было показано, что все ранее известные ингибиторы nAChRc специфично связываются только с дефинитивной формой рецептора, но не взаимодействуют с фетальной. Первые токсины, специфично связывающиеся с  $\alpha/\gamma$  сайтом nAChRc млекопитающих, были обнаружены в яде конусов [113].

Среди  $\alpha$ -конотоксинов обнаружены ингибиторы всех классов никотин-чувствительных рецепторов, описанных выше [107]. Некоторые подсемейства  $\alpha$ -конотоксинов распространены только в пределах групп близкородственных видов рода *Conus* – примером может служить подсемейство конотоксинов  $\alpha$ -3/5, являющееся основным ядом рыбоядных конусов группы *Pionoconus* [27]. Эти олигопептиды имеют общую первичную структуру  $CSX_3CX_5C$ , где X представляет любой а.о., а по механизму воздействия представляют собой паралитические токсины, воздействующие на nAChRc мышечного типа [105]. Тестирование этих токсинов на nAChRc млекопитающих показало их высокую специфичность к одному или двум

конкретным сайтам связывания ацетилхолина. Так,  $\alpha$ -конотоксин МІ проявлял сродство к сайту  $\alpha 1/\delta$ , в 104 превышающее сродство к сайту  $\alpha 1/\gamma$ . Высокое сродство МІ к сайту  $\alpha 1/\delta$  определяется его специфичным взаимодействием с аминокислотными остатками  $\delta$ -субъединицы ионного канала [115]. Интересно, что наиболее полно охарактеризованные конотоксины  $\alpha 3/5$  подсемейства (МІ и GІ) проявляют существенно большую специфичность к nAChRc мышечного типа, чем другие известные ингибиторы nAChRc-рецепторов. Например,  $\alpha$ -бунгаротоксин ингибирует как nAChRc мышечного типа, так и рецепторы подтипа  $\alpha 7$ , а кураре помимо мышечных nAChRc ингибирует и многие известные никотин-чувствительные ионные каналы нейронов [110].

Часто секрет ядовитой железы одного экземпляра *Conus* содержит целый набор индивидуальных токсинов подсемейства  $\alpha 3/5$ , кодируемых разными генами. Например, яд рыбоядного *C. striatus* содержит конотоксины SI, SIA и SII подсемейства  $\alpha 3/5$ , различающиеся по первичной структуре, но вызывающие сходный физиологический эффект – паралич мышц жертвы [2]. Однако, эффект этих конотоксинов на nAChRc высших позвоночных существенно менее предсказуем: некоторые конотоксины подсемейства  $\alpha 3/5$ , такие как МІ и GІ, являются крайне эффективными ингибиторами мышечных nAChRc, в то время, как другие, как, например, SI, существенно менее активны [116].

Другое специфичное подсемейство  $\alpha$ -конотоксинов –  $\alpha 4/3$ , имеющих в своей структуре мотив  $-CCX_4CX_3C-$ . Эти конотоксины отмечены у группы близких видов конусов, питающихся полихетами семейства *Amphinomidae* [117]. Лучше всего из этой группы характеризованы два токсина, выделенные из яда *C. imperialis* – ImI и ImII. Оба этих токсина специфически ингибируют гомомерные никотин-зависимые ионные каналы беспозвоночных. Тестирование их активности на позвоночных выявило, что оба токсина специфично ингибируют рецепторы подтипа  $\alpha 7$  [117,118]. В настоящий момент предполагается, что все токсины  $\alpha 4/3$  подсемейства специфичны к гомомерным nAChRc.

Исследование молекулярного взаимодействия ImI с рецепторами подтипа  $\alpha 7$  показало, что этот токсин связывается с сайтом связывания ацетилхолина, и, таким образом, функционирует как конкурентный ингибитор  $\alpha 7$  рецепторов [119-121]. Конотоксин ImII по строению крайне схож с ImI (9 из 12 аминокислот этих токсинов идентичны), и, как было показано, также ингибирует nAChRc рецепторы  $\alpha 7$  подтипа. Однако, совершенно неожиданно было показано, что ImII не является конкурентным ингибитором, взаимодействующим с сайтом связывания ацетилхолина [122].

Показано, что ключевую роль во взаимодействии ImI с сайтом связывания ацетилхолина играет остаток пролина (Pro-5), тогда как в молекуле ImII в этом положении находится остаток аргинина. Соответственно, токсин ImII связывается с другим сайтом nAChRc подтипа  $\alpha 7$ , который пока неизвестен. Характерно, что большинство  $\alpha$ -конотоксинов функционируют как конкурентные ингибиторы nAChRc и большинство  $\alpha$ -конотоксинов содержат остаток пролина. Вероятно, этот остаток может быть использован как своеобразный индикатор, указывающий на молекулярный механизм связывания  $\alpha$ -конотоксинов. Однако, структурные исследования подтвердили неконкурентное ингибирование  $\alpha$ -конотоксинами только гомомерных nAChRc. Молекулярная кинетика  $\alpha$ -конотоксинов, лишённых остатка пролина, взаимодействующих с гетеромерными nAChRc, пока не известны [122].

## КОНОТОКСИНЫ

Самое крупное и широко распространенное подсемейство  $\alpha$ -конотоксинов -  $\alpha$ -4/7 ( $-\text{CCX}_4\text{CX}_7\text{C}-$ ). Несмотря на то, что каждый конкретный конотоксин этой группы весьма специфичен, в целом подсемейство  $\alpha$ -4/7 характеризуется широким спектром ингибируемых никотин-чувствительных ацетилхолиновых рецепторов. Так  $\alpha$ -EI, как и представители  $\alpha$ -3/5 подсемейства, взаимодействует с гетеромерными nAChRc мышечного типа,  $\alpha$ -PnIB взаимодействует с гомомерными nAChRc  $\alpha$ 7 подтипа, а токсины  $\alpha$ -MII и  $\alpha$ -AuIB ингибируют nAChRc нейронов [123]. Характерно, что даже незначительные изменения первичной структуры конотоксинов семейства  $\alpha$ -4/7 могут повлиять на специфичность их действия. Например последовательности конотоксинов  $\alpha$ -PnIA и  $\alpha$ -PnIB, выделенных из яда *C. repnaseus*, различаются двумя аминокислотными остатками, при этом PnIA высоко специфичный ингибитор  $\alpha$ 3 $\beta$ 2-nAChR, а  $\alpha$ -PnIB ингибирует гомомерные nAChRc  $\alpha$ 7 подтипа. При этом химерный олигопептид, полученный из  $\alpha$ -PnIA и  $\alpha$ -PnIB [124], имел даже большее сродство к рецепторам  $\alpha$ 7 подтипа, чем оба исходных токсина, при альтернативном соединении элементов  $\alpha$ -PnIA и  $\alpha$ -PnIB полученный олигопептид "обратного" состава, напротив имел незначительное сродство к исследуемым рецепторам.

$\alpha$ -Конотоксины подробно описаны в литературе, им посвящены несколько крупных обзоров, опубликованных за последние несколько лет [106, 107, 125], где приведена более исчерпывающая информация по их разнообразию и механизмам действия.

### 5.2. Другие семейства конопептидов, взаимодействующие с лигандзависимыми ионными каналами.

Кроме  $\alpha$ -конотоксинов известно ещё по крайней мере 2 семейства конотоксинов, взаимодействующих с никотин-чувствительными ацетилхолиновыми рецепторами. Как и  $\alpha$ -конотоксины, представители этих семейств,  $\alpha$ A- и  $\psi$ -конотоксины блокируют ионную проницаемость nAChRc. Все исследованные  $\alpha$ A- и  $\psi$ -конотоксины взаимодействуют с nAChRc мышечного типа [126, 127].

$\alpha$ A-Конотоксины структурно отличаются от  $\alpha$ -конотоксинов наличием трёх дисульфидных связей в молекуле ( $\alpha$ -конотоксинов содержат только две). При этом,  $\alpha$ A-конотоксины, также являющиеся конкурентными ингибиторами nAChRc, не имеют столь высокой специфичности к  $\alpha$ 1/ $\delta$ -сайту связывания ацетилхолина [128, 129]. Как и  $\alpha$ -,  $\alpha$ A-конотоксины присутствуют только в яде небольшого числа близкородственных рыбоядных моллюсков рода *Conus*.  $\psi$ -Конотоксины обычно присутствуют в яде тех же видов конусов, что и  $\alpha$ A-конотоксины. В отличие от  $\alpha$ - и  $\alpha$ A-конотоксинов,  $\psi$ -конотоксины скорее всего не являются конкурентными ингибиторами никотиновых рецепторов мышечного типа [25].

В настоящее время оба этих семейства конотоксинов относительно слабо изучены. На данный момент определена структура нескольких  $\alpha$ A- и двух  $\psi$ -конотоксинов -  $\psi$ -конотоксины структурно ближе всего к  $\mu$ -, и кМ-конотоксинам, однако, молекулярная специфичность этих семейств токсинов значительно отличается [130-133].

Ещё одна группа лигандзависимых рецепторов первой группы, ингибируемая высокоспецифичным семейством конотоксинов – рецепторы серотонина (5-НТ3). Необычный конопептид, содержащий остаток бромотриптофана,  $\sigma$ -конотоксин GVIIIA, при изучении молекулярной специфичности показал высокое сродство к 5-НТ3-рецепторам [134]. На данный момент это единственный известный токсин белковой природы,



для которого характерно взаимодействие с 5-HT<sub>3</sub>-рецепторами. Молекулярная специфичность других конопептидов, относящихся к тому же надсемейству, что и GVIIA, остается пока неизвестной, однако, принимая во внимание их значительное отличие по первичной структуре, маловероятно, что они, как и GVIIA, взаимодействуют с 5-HT<sub>3</sub> рецепторами.

Представители особой группы конопептидов, характеризующиеся отсутствием цистеинового скелета, конантокины (conantokins), также взаимодействуют с лигандзависимыми ионными каналами, в частности с NMDA-подтипом глутамат-зависимых каналов [7, 35].

Согласно современным представлениям, рецепторы NMDA-подтипа представляют собой тетрамеры, образованные субъединицами двух разных типов, NR1 и NR2 [135]. На данный момент был обнаружен только один ген, кодирующий NR1-субъединицу. При этом было показано, что четыре структурно различающихся типа NR2-субъединицы NR2A, NR2B, NR2C и NR2D кодируются четырьмя отдельными генами [2].

Из всех пептидов конусов, взаимодействующих с NMDA рецепторами, лучше всего изучен конантокин-G. Он представляет собой короткий линейный олигопептид, состоящий из 17 аминокислотных остатков, не содержащий остатков цистеина. При этом конантокин G включает 5 остатков  $\gamma$ -карбоксиглутамата (Gla) [25]. Gla синтезируется из глутамата зависимым от витамина K ферментом  $\gamma$ -глутамилкарбоксилазой. Конантокин-G, полученный из яда моллюсков рода *Conus*, был первым пептидом, содержащим остатки Gla, обнаруженным у беспозвоночных. При этом  $\gamma$ -глутамилкарбоксилаза, клонированная из ядовитой железы *Conus*, характеризуется неожиданно высокой степенью гомологии с  $\gamma$ -глутамилкарбоксилазой, экспрессируемой млекопитающими [32, 136]. На данный момент предполагается, что при отсутствии цистеинового скелета именно остатки  $\gamma$ -карбоксиглутамата играют основную роль в определении конформации молекулы конантокина-G.

Воздействие NMDA на компетентные рецепторы приводит в частности к активации каскадного механизма и синтезу cGMP [137]. При обработке неонатальных препаратов мозжечка крысы конантокином-G было показано, что последующее добавление NMDA не приводит к увеличению концентрации cGMP, в то же время обработка конантокином-G не влияла на функционирование каинатных рецепторов [138]. Исследование молекулярной специфичности конантокина-G показало, что этот токсин, действуя в субмикромольных концентрациях, специфически связывается с NR2B-субъединицей NMDA-рецептора [2], но при этом не оказывает никакого эффекта на рецепторы, содержащие NR2A-субъединицу, даже при концентрации 50 мкМ [139].

Воздействие конантокина-G на организм млекопитающих зависит от их возраста. Так, введение указного токсина молодой мыши вызывает у неё состояние, напоминающее сон, тогда как при введении возрастной мыши конантокин-G, напротив, вызывает гиперактивное состояние [140, 141].

В более поздних исследованиях охарактеризованы и некоторые другие конантокины, выделенные из яда рыбоядных видов рода *Conus*, специфично блокирующие NMDA-рецепторы (конантокин-B $\gamma$  [142], конантокин-L [143], конантокин-P [144], конантокин-R [145]). Исследования молекулярной специфичности этих токсинов показали, что они с одинаковой эффективностью связываются с субъединицами NR2A и NR2B [145]. Исследования молекулярной специфичности конантокина-T показали, что этот олигопептид не связывается с NMDA рецепторами, содержащими NR2D-субъединицы [145].

## КОНОТОКСИНЫ

Контулакин-G, выделенный из ядовитой железы *Conus geographus* является единственным известным на данный момент пептидом беспозвоночных, взаимодействующим с нейротензиновыми рецепторами [10]. Структурно контулакин-G представляет собой 16-членный олигопептид, содержащий посттрансляционно  $\alpha$ -гликозилированный остаток Trp-10; с-концевой участок этого пептида близок по строению с нейротензинами. Внутривенное введение синтетически гликозилированного контулакина-G мыши приводило к двигательным расстройствам, аналогичный эффект вызывало введение нативного контулакина-G. Гликозилированный контулакин-G оказывает эффект при концентрациях на порядок меньших, чем не гликозилированный в положении Thr10 контулакин-G. Контулакин-G, как и не гликозилированный в положении Thr10 контулакин-G взаимодействуют с разнообразными нейротензиновыми рецепторами млекопитающих – человека (первого типа - hNTR1), крысы (первого и второго типа), и мыши (третьего типа) [29]. Физиологически оба этих олигопептида представляет собой агонисты нейротензиновых рецепторов [10].

Данные по некоторым другим конопептидам, взаимодействующим с различными лиганд-зависимыми ионными каналами и клеточными рецепторами суммированы в таблице 1. Исследования физиологической активности этих рецепторов находятся на начальных стадиях, так что на данный момент о них известно немного. Молекулярные мишени и эффекты большинства из них остаются неизученными, многие из них, предположительно активны только в системах беспозвоночных [25].

Таблица 1. Некоторые малоизученные конопептиды, не относящиеся к основным типам.

Название конопептида	Вид <i>Conus</i>	Молекулярная мишень или эффект	Первичная структура
<b>Биомиметики рецепторов, связанных с G-белком (GPCR)</b>			
Контупрессин-G	<i>C. geographus</i>	Вазопрессинные рецепторы	CFIRNCPLG
Контужин-G	<i>C. geographus</i>	Нейротензиновые рецепторы	ZSEEGGSNFNKKPYIL
Р-контотоксин TIA	<i>C. tulipa</i>	$\alpha_1$ -адренергические рецепторы	PNWRCCLIPACRRNHKKFC
<b>Прочие</b>			
mg5a $\chi$ -Контотоксин	<i>C. magus</i>	Транспорт норадреналина	NGVCCGYKLCHOC
$\mu$ -PnIVA	<i>C. pennsylvanicus</i>	Na-каналы моллюсков	CCKYGWTCLLGCSPCGC
$\gamma$ -Контотоксин PnVIA	<i>C. pennsylvanicus</i>	Ионные каналы пейсмекеров моллюсков	DCTSWFGRCTVNS <sub>7</sub> CCSN-SCDQTYC <sub>7</sub> LYAFOS
Конторфамид	<i>C. spurius</i>	RF-амидные рецепторы, ENaC каналы	GPMGWVPVYRF
Контрифан-R	<i>C. radialis</i>	Ca-активируемые K-каналы	GCOWEPWC
Контонезин-Mt1	<i>C. mustelinus</i>	Мембраны эукариотических клеток	FHPSLWVLIPQYIQLIRKIL-KSG
Контонезин-Mt2			FHPSLWVLIPQYIQLIRKIL-KS

## 6. РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ КОНОТОКСИНОВ.

Как было показано выше, конотоксины специфично взаимодействуют с ионными каналами возбудимых тканей, вызывая нарушение передачи нервных импульсов в нервной системе, или, блокируя нервно-мышечную передачу. Большинство лекарственных препаратов, разрабатываемых на основе конотоксинов и проходящих клинические испытания, оказывают обезболивающее действие, или показаны при неврологических расстройствах, мигренях и эпилепсии [10]. Недавно было продемонстрировано, что некоторые конотоксины имеют ярко выраженное кардиопротекторное действие [11].

Применение конотоксинов-блокаторов потенциалзависимых ионных каналов,  $\mu$ -SIIA,  $\mu$ O-MrVIB, а так же  $\omega$ -конотоксинов MVIIA и CVID, основано на блокировании синаптической передачи аффлекторных цепочек нейронов. Основная молекулярная мишень этих конотоксинов и разработанных на их основе препаратов – натриевые или кальциевые каналы “нервного” типа, располагающиеся в синаптических окончаниях спинного мозга. Эти синаптические окончания обеспечивают передачу нервных импульсов от нейронов периферической нервной системы в головной мозг, создавая болевые ощущения [10].

Препараты, разработанные на основе конотоксинов, имеют явные преимущества по сравнению с другими обезболивающими. В отличие от обезболивающих опиоидного ряда, препараты, разработанные на основе конотоксинов, не вызывают снижения концентрации специфических рецепторов и, соответственно, их введение не связано с необходимостью корректировать дозировку. Кроме того, в отличие от морфина и других опиатов они не вызывают привыкания и пристрастия [10].

Наиболее полно изучен фармакологический эффект препарата зиконотид, известного под коммерческим названием Prialt. Этот препарат разработан на основе  $\omega$ -конотоксина MVIIA, блокатора кальциевых каналов N-типа. Зиконотид был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) в 2004 году. Зиконотид характеризуется сильным обезболивающим действием, превосходящим действие морфина; поскольку зиконотид имеет принципиально отличный механизм действия, он может использоваться совместно с морфином или его производными. Основные показания к применению зиконотида – хронические боли, причем препарат активно используется при обезболивании пациентов, страдающих от злокачественных опухолей или СПИД. Фармакологический эффект зиконотида более подробно описан во многих публикациях [10, 146].

Фармакологический эффект препаратов, разрабатываемых на основе конотоксинов – антагонистов никотинзависимых ацетилхолиновых рецепторов,  $\alpha$ -Vc1.1 и  $\alpha$ -RgIA основан на блокировании рецепторов сенсорных нейронов типа  $\alpha 9\alpha 10$ . Для обоих этих конотоксинов показано значительное обезболивающее действие в различных болевых моделях крысы. На данный момент препарат ACV-1 на основе конотоксина  $\alpha$ -RgIA проходит заключительную стадию клинических испытаний. NMDA-рецепторы, блокируемые конантокинами, играют важную роль при некоторых острых и хронических неврологических расстройствах [10]. Связанные с NMDA-рецепторами кальциевые каналы в активированном состоянии имеют исключительно высокую ионную проницаемость. Их избыточная активация может вести к массивному перевозбуждению

и смерти нейронов. Исследование фармакологического эффекта конантокинов при индуцированной интенсивной боли, конвульсиях и пост-ишемии выявило высокую активность конантокина-G. На его основе был разработан препарат CGX-1007 (Cognetix), проходящий клинические испытания [147]. Основные показания к применению CGX-1007 – интенсивная боль и эпилепсия, кроме того для препарата был доказан нейропротекторный эффект в модели ишемии крысы [148].

Инtrateкальное ведение контулакина-G приводит к блокированию передачи нервных импульсов в аффлекторных цепях нейронов и даёт значительный обезболивающий эффект. На основе контулакина-G разработан препарат GCX-1160, проходящий клинические исследования. Показания к применению этого препарата включают в себя интенсивные боли, связанные с травматическими дисфункциями спинного мозга [10].

Препарат Xen 2174, разработанный на основе химически модифицированного  $\chi$ -конотоксина Mg, также обладает обезболивающим эффектом. Xen 2174 обеспечивает обратимое неконкурентное блокирование транспорта норадреналина, осуществляемого посредством специфичного транспортера (NET), при этом не влияет на транспорт других моноаминов, таких как серотонин и дофамин [149]. Сайт связывания Xen 2174 NET человека частично перекрывается с сайтами связывания кокаина и антидепрессанта десипрамина [150]. Исследования фармакологического действия Xen 2174 показали, что этот препарат имеет сильный обезболивающий эффект у пациентов, имеющих злокачественные опухоли или повреждения спинного мозга. Недавно препарат Xen 2174 был признан безопасным и эффективным для снятия болевых синдромов при онкологических заболеваниях [10]. На данный момент он находится в завершающей фазе клинических исследований.

Список конотоксинов, которые являются прототипами для разработки лекарственных средств, приведён в таблице 2.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Конопептиды представляют собой крупную группу физиологически активных олигопептидов, имеющих самые разнообразные молекулярные мишени и характеризующихся высокой физиологической специфичностью. Скоординированное действие десятков индивидуальных токсинов, содержащихся в яде моллюсков рода *Conus*, играет ключевую роль при охоте или защите этих животных, причем состав яда каждого конкретного вида *Conus* отражает специфику его питания и взаимодействия с хищниками, и, возможно, конкурентами. Систематическое исследование конопептидов позволило выявить разнообразие их физиологических эффектов, и во многих случаях объяснить их механизмы. Исключительная молекулярная специфичность и разнообразие конопептидов делают их важным потенциальным ресурсом для фармацевтики и индустрии лекарственных препаратов, что позволяет разрабатывать на их основе высокоэффективные препараты, в основном используемые при нарушениях функционирования нервной системы. С другой стороны конопептиды активно используются при изучении молекулярных основ функционирования специфичных ионных каналов и их вклада в работу нервной системы в целом. Результаты, полученные при исследовании конопептидов, однозначно свидетельствуют о необходимости пристального исследования биохимии всего разнообразия животных и растительных организмов, так как современная практика в основном ограничивается исследованием биохимии крайне ограниченного числа модельных объектов.



Таблица 2. Конопептиды-прототипы для разработки лекарственных средств.

<b>Конопептид</b>	<b>Фармакологическое название</b>	<b>Показание</b>	<b>Молекулярный мишень/механизм</b>
<b><math>\omega</math>-MVII-A</b>	<b>Зиконотид (торговая марка Prialt)</b>	<b>Некулируемые боли, например, при злокачественных опухолях</b>	<b>Блокатор N-типа Са-каналов</b>
<b><math>\omega</math>-CVID</b>	<b>AM-336</b>	<b>Нейропатические боли</b>	<b>Блокатор N-типа Са-каналов</b>
<b>Конгуажин-G</b>	<b>CGX-1160</b>	<b>Нейропатические боли</b>	<b>Агонист нейротензиновых рецепторов</b>
<b>Конантокин-G</b>	<b>CGX-1007</b>	<b>Некулируемая знобелость</b>	<b>Антагонист NMDA рецепторов</b>
<b><math>\chi</math>-MrIA</b>	<b>Xen2174</b>	<b>Нейропатические боли</b>	<b>Ингибитор транспорта норадреналина</b>
<b><math>\alpha</math>-Vc1.1</b>	<b>ACV-1</b>	<b>Нейропатические боли</b>	<b>Антагонист nAChRc</b>
<b><math>\kappa</math>-PVIIA</b>	<b>CGX-1051</b>	<b>Инфаркт миокарда, кардиопротекторный эффект</b>	<b>Блокатор К-каналов</b>
<b><math>\mu</math>O-MrVIB</b>	<b>CGX-1002</b>	<b>Нейропатические боли</b>	<b>Селективный блокатор натриевых каналов</b>
<b><math>\mu</math>-SIIIA</b>	<b>PEG-SIIIA</b>	<b>Воспалительные боли</b>	<b>Блокатор натриевых каналов</b>
<b>Не присвоено</b>	<b>CGX-1204</b>	<b>Мышечный релаксант</b>	<b>Антагонист nAChRc</b>

Слепой, основанный на комбинаторных библиотеках соединений поиск искусственных ингибиторов рецепторов человека, играющих роль в патогенезе различных заболеваний, зачастую является затратным и технически сложным мероприятием. Одним из путей поиска прототипов лекарственных средств является их обнаружение в секретах и ядах ядовитых и кровососущих животных. Тот путь, который исследователи планируют преодолеть за несколько лет разработки лекарственного средства *de novo*, природа проходила в течение миллионов лет. Таким образом, исследование физиологически активных компонентов многих видов животных новейшими методами молекулярной биологии может обеспечить реализацию трансляционной медицины [151] в сжатые сроки. Ярким примером такого переноса фундаментальных знаний к постели пациента является разработка на основе  $\omega$ -конотоксина обезболивающего препарата зиконотид. Большим подспорьем в исследовании указанных организмов будет секвенирование современными методами их геномов, что обеспечит быстрый доступ к структуре белковых токсинов и протеазных ингибиторов. Значимые научные предпосылки к исследованию секретов и ядов животных созданы в последние годы, в том числе, при участии российских исследователей. Примерами могут служить исследования конотоксинов [118], секрета слюнных желез медицинской пиявки [152], ядов змей [153] и паукообразных [154].

1. *Rockel D.W., Korn A.J.* (1995) Manual of the Living Conidae, Christa Hemmen, Wiesbaden.
2. *Terlau H., Olivera B.M.* (2004) *Physio. Rev.*, **84**, 41-68.
3. *Garrett J.E., Buczek O., Watkins M., Olivera B.M., Bulaj G.* (2005) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **328**, 362-367.
4. *Buczek O., Wei D., Babon J.J., Yang X., Fiedler B., Chen P., Yoshikami D., Olivera B.M., Bulaj G., Norton R.S.* (2007) *Biochemistry*, **46**, 9929-9940.
5. *Biass D., Dutertre S., Gerbault A., Menou J.L., Offord R., Favreau P., Stöcklin R.* (2009) *J. Proteomics*, **72**, 210-218.
6. *Cruz L.J., Gray W.R., Olivera B.M.* (1978) *Arch. Biochem. Biophys.*, **190**, 539-548.
7. *Olivera B.M., Gray W.R., Zeikus R., McIntosh J.M., Varga J., Rivier J., de Santos V., Cruz L.J.* (1985) *Science*, **230**, 1338-1343.
8. *McGivern J.G.* (2006) *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, **5**, 587-603.
9. *Teichert R.W., Rivier J., Torres J., Dykert J., Miller C., Olivera B.M.* (2005) *J. Neuroscience*, **25**, 732-736.
10. *Han K.H., Hwang K.J., Kim S.M., Kim S.K., Gray W.R., Olivera B.M., Rivier J., Shon K.J.* (1997) *Biochemistry*, **36**, 1669-1677.
11. *Twede V.D., Miljanich G., Olivera B.M., Bulaj G.* (2009) *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, **12**, 231-239.
12. *Kohn A.J.* (1990) *Malacologia*, **32**, 55-67.
13. *Kantor Y.I., Taylor J.D.* (2000) *J. Zool.*, **252**, 251-262.
14. *Kohn A.J., Nishi N., Bruno P.* (1999) *Journal Molluscan Studies*, **65**, 461-481.
15. *Kohn A.J.* (1959) *Ecological Monographs*, **29**, 47-90.
16. *Duda T.F., Kohn A.J., Palumbi S.R.* (2008) *Biological Journal of the Linnean Society*, **73**, 391-409.
17. *Le Gall F.* (1999) *Toxicon*, **37**, 985-998.
18. *Kohn A.J.* (1963) In: *Venomous and poisonous animals and noxious plants of the Pacific area* (Keegan H.L., ed.), Pergamon Press, NY., pp. 83-96.
19. *Endean R., Parish G., Gyr P.* (1974) *Toxicon*, **12**, 131-138.
20. *Taylor J.D., Kantor Y.I., Sysoev A.V.* (1993) *Bulletin of the Natural History Museum. Zoology series*, **59**, 125-170.
21. *Bouchet P., Lozouet P., Maestrati P., Heros V.* (2002) *Biological Journal of the Linnean Society*, **75**, 421-436.
22. *Imperial J.S., Watkins M., Chen P., Hillyard D.R., Cruz L.J., Olivera B.M.* (2003) *Toxicon*, **42**, 391-398.
23. *Watkins M., Hillyard D.R., Olivera B.M.* (2006) *J. Mol. Evol.*, **62**, 247-256.
24. *Heralde F.M., Imperial J., Bandyopadhyay P.K., Olivera B.M., Concepcion G.P., Santos A.D.* (2008) *Toxicon*, **51**, 890-897.
25. *Norton R.S., Olivera B.M.* (2006) *Toxicon*, **48**, 780-798.
26. *Olivera B.M.* (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 31173-31177.
27. *Puillandre N., Watkins M., Olivera B.M.* (2010) *J. Mol. Evol.*, Epub ahead of print.
28. *Woodward S.R., Cruz L.J., Olivera B.M., Hillyard D.R.* (1990) *EMBO J.*, **9**(4), 1015-1020.
29. *Craig A. Grey B.P., Olivera B.M.* (1999) *Eur. J. Biochem.*, **264**(2), 271-275.
30. *Craig A.G., Zafaralla G., Cruz L.J., Santos A.D., Hillyard D.R., Dykert J., Dela R.G., Sporning A., Terlau H., West P.J., Yoshikami D., Olivera B., Rivier J.E., Gray W.R., Imperial J.M.* (1998) *Biochemistry*, **37**, 16019-16025.

31. *Jiménez E.C., Olivera B.M., Gray W.R., Cruz L.J.* (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 28002-28005.
32. *Bandyopadhyay P.K., Garrett J.E., Shetty R.P., Keate T., Walker C.S., Olivera B.M.* (2002) *PNAS*, **99**, 1264-1269.
33. *Loughnan M., Bond T., Atkins A., Cuevas J., Adams D.J., Broxton N.M., Livett B.G., Down J.G., Jones A., Alewood P.F.* (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 15667-15674.
34. *Biggs J.S., Rosenfeld Y., Shai Y., Olivera B.M.* (2007) *Biochemistry*, **46**, 12586-12593.
35. *McIntosh J.M., Olivera B.M., Cruz L.J., Gray W.R.* (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 14343-14346.
36. *Bandyopadhyay P.K.* (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 5447-5450.
37. *Espiritu D.J., Watkins M., Dia-Monje V., Cartier G.E., Cruz L.J., Olivera B.M.* (2001) *Toxicon*, **39**, 1899-1916.
38. *Olivera B.M., Cruz L.J., Yoshikami D.* (1999) *Curr. Op. Neurobiol.*, **9**, 772-777.
39. *Bezanilla F.* (2000) *Physiol. Rev.*, **80**, 555-592.
40. *Hille B.* (1992) *Ion Channels of Excitable Membranes*, Sinauer, Sunderland, MA, USA.
41. *Doyle D.A.* (1998) *Science*, **280**, 69-77.
42. *Corpus G.P., Jacobsen R.B., Jimenez E.C., Watkins M., Walker C., Colledge C., Garrett J.E., McDougal O., Li W., Gray W.R., Hillyard D.R., Rivier J., McIntosh J.M., Cruz L.J., Olivera B.M.* (2005) *Biochemistry*, **44**, 8176-8186.
43. *Scott D.* (2002) *Eur. J. Pharm.*, **451**, 279-286.
44. *Ekberg J., Craik D.J., Adams M.E.* (2008) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **40**, 2363-2368.
45. *Catterall W.A.* (2000) *Neuron*, **26**, 13-25.
46. *Goldin A.L.* (2001) *Ann. Rev. Physiol.*, **63**, 871-894.
47. *Ogata N., Ohishi Y.* (2002) *Jap. J. Pharmacol.*, **88**, 365-377.
48. *Floresca C.Z.* (2003) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **190**, 95-101.
49. *Catterall W.A.* (1992) *Physiol. Rev.*, **72**, 15-48.
50. *Adams M.E., Olivera B.M.* (1994) *Trends in Neurosciences*, **17**, 151-155.
51. *Cruz L.J., Gray W.R., Olivera B.M., Zeikus R.D., Kerr L., Yoshikami D., Moczydlowski E.* (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 9280-9288.
52. *Cruz L.J., Kupryszewski G., LeCheminant G.W., Gray W.R., Olivera B.M., Rivier J.* (1989) *Biochemistry*, **28**, 3437-3442.
53. *Becker S., Prusak-Sochaczewski E., Zamponi G., Beck-Sickinger A.G., Gordon R.D., French R.J.* (1992) *Biochemistry*, **31**, 8229-8238.
54. *Moczydlowski E., Olivera B.M., Gray W.R., Strichartz G.R.* (1986) *PNAS*, **83**, 5321-5325.
55. *Dudley S.C., Todt H., Lipkind G., Fozzard H.A.* (1995) *Biophys. J.*, **69**, 1657-1665.
56. *Chahine M., Sirois J., Marcotte P., Chen L., Kallen R.G.* (1998) *Biophys. J.*, **75**, 236-246.
57. *Hui K., Lipkind G., Fozzard H.A., French R.J.* (2002) *J. Gen. Physiol.*, **119**, 45-54.
58. *French R.J., Prusak-Sochaczewski E., Zamponi G.W., Becker S., Kularatna A.S., Horn R.* (1996) *Neuron*, **16**, 407-413.
59. *Hidalgo P., MacKinnon R.* (1995) *Science*, **268**, 307-310.
60. *Shon K.J., Olivera B.M., Watkins M., Jacobsen R.B., Gray W.R., Floresca C.Z., Cruz L.J., Hillyard D.R., Brink A., Terlau H., Yoshikami D.* (1998) *J. Neurosci.*, **18**, 4473-4481.

# КОНОТОКСИНЫ

61. *Nielsen K.J., Watson M., Adams D.J., Hammarström A.K., Gage P.W., Hill J.M., Craik D.J., Thomas L., Adams D., Alewood P.F., Lewis R.J. (2002) J. Biol. Chem., 277, 27247-27255.*
62. *Zhang M.M., Green B.R., Catlin P., Fiedler B., Azam L., Chadwick A., Terlau H., McArthur J.R., French R.J., Gulyas J., Rivier J.E., Smith B.J., Norton R.S., Olivera B.M., Yoshikami D., Bulaj G. (2007) J. Biol. Chem., 282, 30699-30706.*
63. *Zhang M.M., Fiedler B., Green B.R., Catlin P., Watkins M., Garrett J.E., Smith B.J., Yoshikami D.B., Olivera M., Bulaj G. (2006) Biochemistry, 45, 3723-3732.*
64. *Wang C.Z., Zhang H., Jiang H., Lu W., Zhao Z.Q., Chi C.W. (2006) Toxicon, 47, 122-132.*
65. *Terlau H., Stocker M., Shon K.J., McIntosh J.M., Olivera B.M. (1996) J. Neurophysiol., 76, 1423-1429.*
66. *Bulaj G., Zhang M.M., Green B.R., Fiedler B., Layer R.T., Wei S., Nielsen J.S., Low S.J., Klein B.D., Wagstaff J.D., Chicoine L., Harty T.P., Terlau H., Yoshikami D., Olivera B.M. (2006) Biochemistry, 45, 7404-7414.*
67. *Daly N.L., Ekberg J.A., Thomas L.D., Adams J., Lewis R.J., Craik D.J. (2004) J. Biol. Chem., 279, 25774-25782.*
68. *Ekberg J., Jayamanne A., Vaughan C.W., Aslan S., Thomas L., Mould J., Drinkwater R., Baker M.D., Abrahamsen B., Wood J.N., Adams D.J., Christie M.J., Lewis R.J. (2006) PNAS, 103, 17030-17035.*
69. *McIntosh J.M., Hasson A., Spira M.E., Gray W.R., Li W., Marsh M., Hillyard D.R., Olivera B.M. (1995) J. Biol. Chem., 270, 16796-16802.*
70. *Safo P., Rosenbaum T., Shcherbatko A., Choi D.Y., Han E., Toledo-Aral J.J., Olivera B.M., Brehm P., Mandel G. (2000) J. Neuroscience, ???, 76-80.*
71. *Zorn S., Leipold E., Hansel A., Bulaj G., Olivera B.M., Terlau H., Heinemann S.H. (2006) FEBS Lett., 580, 1360-1364.*
72. *Fainzilber M., Lodder J.C., van der Schors R.C., Li K.W., Yu Z., Burlingame A.L., Geraerts W.P., Kits K.S. (1996) Biochemistry, 35, 8748-8752.*
73. *West P.J., Bulaj G., Yoshikami D. (2005) J. Neurophysiol., 94, 3916-3924.*
74. *Barbier J., Lamthanh H., Le Gall F., Favreau P., Benoit E., Chen H., Gilles N., Ilan N., Heinemann S.H., Gordon D., Ménez A., Molgó J. (2004) J. Biol. Chem., 279, 4680-4685.*
75. *Kaufenstein S., Huys I., Kuch U., Melaun C., Tytgat J., Mebs D. (2004) Toxicon, 44, 539-548.*
76. *Buczek O., Yoshikami D., Watkins M., Bulaj G., Jimenez E.C., Olivera B.M. (2005) FEBS J., 272, 4178-4188.*
77. *Buczek O., Yoshikami D., Bulaj G., Jimenez E.C., Olivera B.M. (2005) J. Biol. Chem., 280, 4247-4253.*
78. *Hille B. (2001) Ion Channels of Excitable Membranes (3rd Edition), Sinauer Associates, Sunderland, USA.*
79. *Judge S., Bever C.T. (2006) Pharmacol. Ther., 111, 224-259.*
80. *Terlau H., Shon K.J., Grilley M., Stocker M., Stühmer W., Olivera B.M. (1996) Nature, 381, 148-151.*
81. *Ferber M., Sporning A., Jeserich G., DeLaCruz R., Watkins M., Olivera B.M., Terlau H. (2003) J. Biol. Chem., 278, 2177-2183.*
82. *Jimenez E.C., Shetty R.P., Lirazan M., Rivier M., Walker C., Abogadie F.C., Yoshikami D., Cruz L.J., Olivera B.M. (2003) J. Neurochem., 85, 610-621.*
83. *Baumann A., Grupe A., Ackermann A., Pongs O. (1988) EMBO J., 7, 2457-2463.*
84. *Ferber M.A., Al-Sabi A., Stocker M., Olivera B.M., Terlau H. (2004) Toxicon, 43, 915-921.*



85. Zhang S.J., Yang X.M., Liu G.S., Cohen M.V., Pemberton K., Downey J.M. (2003) *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **42**, 764-771.
86. Lubbers N.L., Campbell T.J., Polakowski J.S., Bulaj G., Layer R.T., Moore J., Gross G.J., Cox B.F. (2005) *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **46**, 141-146.
87. Jacobsen R.B., Koch E.D., Lange-Malecki B., Stocker M., Verhey J., van Wagoner R.M., Vyazovkina A., Olivera B.M., Terlau H. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 24639-24644.
88. 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. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 4302-4309.
89. Savarin P., Guenneugues M., Gilquin B., Lamthanh H., Gasparini S., Zinn-Justin S., Münz A. (1998) *Biochemistry*, **37**, 5407-5416.
90. Le Gall F., Favreau P., Benoit E., Mattei C., Bouet F., Menou J.L., Ménez A., Letourneux Y., Molgó J. (1999) *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 3134-3142.
91. Al-Sabi A., Lennartz D., Ferber M., Gulyas J., Rivier J.F., Olivera B.M., Carlomagno T., Terlau H. (2004) *Biochemistry*, **43**, 8625-8635.
92. Kaufenstein S., Huys I., Lamthanh H., Stöcklin R., Sotto F., Menez A., Tytgat J., Mebs D. (2003) *Toxicon*, **42**, 43-52.
93. Sudarslal S., Majumdar S., Ramasamy P., Dhawan R., Pal P.P., Ramaswami M., Lala A.K., Sikdar S.K., Sarma S.P., Krishnan K.S., Balaram P. (2003) *FEBS Lett.*, **553**, 209-212.
94. Catterall W.A., Striessnig J., Snutch T.P., Perez-Reyes E. (2003) *Pharmacol. Rev.*, **55**, 579-581.
95. Ertel E.A., Campbell K.P., Harpold M.M., Hofmann F., Mori Y., Perez-Reyes E., Schwartz A., Snutch T.P., Tanabe T., Birnbaumer L., Tsien R.W., Catterall W.A. (2000) *Neuron*, **25**, 533-535.
96. Spending P.E.R. (1992) *Pharmacol. Rev.*, **44**, 363-376.
97. van Petegem F., Minor D.L. (2006) *Biochem. Soc. Transact.*, **34**, 887-893.
98. Lew M.J., Flinn J.P., Pallaghy P.K., Murphy R., Whorlow S.L., Wright C.E., Norton R.S., Angus J.A. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 12014-12023.
99. Nielsen K.J., Adams D.A., Alewood P.F., Lewis R.J., Thomas L., Schroeder T., Craik D.J. (1999) *Biochemistry*, **38**, 6741-6751.
100. Nadasdi L., Yamashiro D., Chung D., Tarczy-Hornoch K., Adriaenssens P., Ramachandran J. (1995) *Biochemistry*, **34**, 8076-8081.
101. Kobayashi T., Kobayashi M., Gryczynski Z., Lakowicz J.R., Collins J.H. (2000) *Biochemistry*, **39**, 86-91.
102. Hansson K., Ma X., Eliasson L., Czerwiec E., Furie B., Furie B.C., Rorsman P., Stenflo J. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 32453-32463.
103. Unwin N. (2003) *FEBS Lett.*, **555**, 91-95.
104. Gotti C., Clementi F., Fornari A., Gaimarri A., Guiducci S., Manfredi I., Moretti M., Pedrazzi P., Pucci L., Zoli M. (2009) *Biochem. Pharmacol.*, **78**, 703-711.
105. McIntosh J.M., Santos A.D., Olivera B.M. (1999) *Ann. Rev. Biochem.*, **68**, 59-88.
106. Olivera B.M., Teichert R.W. (2007) *Molecular Interventions*, **7**, 251-260.
107. Olivera B.M., Quik M., Vincler M., McIntosh J.M. (2008) *Channels (Austin, Tex.)*, **2**, 143-152.
108. Tavazoie S.F., Tavazoie M.F., McIntosh J.M., Olivera B.M., Yoshikami D. (1997) *Brit. J. Pharmacol.*, **120**, 995-1000.
109. Olivera B.M., Cruz L.J. (2001) *Toxicon*, **39**, 7-14.
110. Arias H.R. (2000) *Neurochem. Int.*, **36**, 595-645.

# КОНОТОКСИНЫ

111. *Arias H.R., Bhumireddy P., Bouzat C.* (2006) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **38**, 1254-1276.
112. *Arneric S.P., Holladay M., Williams M.* (2007) *Biochem. Pharmacol.*, **74**, 1092-1101.
113. *Teichert R.W., López-Vera E., Gulyas J., Watkins M., Rivier J., Olivera B.M.* (2006) *Biochemistry*, **45**, 1304-1312.
114. *Witzemann V., Barg B., Nishikawa Y., Sakmann B., Numa S.* (1987) *FEBS Lett.*, **223**, 104-112.
115. *Sine S.M., Kreienkamp H.J., Bren N., Maeda R., Taylor P.* (1995) *Neuron*, **15**, 205-211.
116. *Groebe D.R., Gray W.R., Abramson S.N.* (1997) *Biochemistry*, **36**, 6469-6474.
117. *Ellison M., Olivera B.M.* (2007) *Chemical Record (New York)*, **7**, 341-353.
118. *Kasheverov I.E., Zhmak M.N., Fish A., Rucktooa P., Khrushchov A.Y., Osipov A.V., Ziganshin R.H., D'hoedt D., Bertrand D., Sixma T.K., Smit A.B., Tsetlin V.I.* (2009) *J. Neurochem.*, **111**, 934-944.
119. *Quiram P.A., Jones J.J., Sine S.M.* (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 19517-19524.
120. *Quiram P.A., Sine S.M.* (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 11001-11006.
121. *Quiram P.A., Sine S.M.* (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 11007-11011.
122. *Ellison M., McIntosh J.M., Olivera B.M.* (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 757-764.
123. *Kulak J.M., McIntosh J.M., Yoshikami D., Olivera B.M.* (2001) *J. Neurochem.*, **77**, 1581-1589.
124. *Luo S., Nguyen T.A., Cartier G.E., Olivera B.M., Yoshikami D., McIntosh J.M.* (1999) *Biochemistry*, **38**, 14542-14548.
125. *Kasheverov I.E., Chiara D.C., Zhmak M.N., Maslennikov I.V., Pashkov V.S., Arseniev A.S., Utkin Y.N., Cohen J.B., Tsetlin V.I.* (2006) *FEBS J.*, **273**, 1373-1388.
126. *Jacobsen R., Yoshikami D., Ellison M., Martinez J., Gray W.R., Cartier G.E., Shon K.J., Groebe D.R., Abramson S.N., Olivera B.M., McIntosh J.M.* (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 22531-22537.
127. *Teichert R.W., Rivier J., Dykert J., Cervini L., Gulyas J., Bulaj G., Ellison M., Olivera B.M.* (2004) *Toxicon*, **44**, 207-214.
128. *Han K.H., Hwang K.J., Kim S.M., Kim S.K., Gray W.R., Olivera B.M., Rivier J., Shon K.J.* (1997) *Biochemistry*, **36**, 1669-1677.
129. *Chi S.-W., Park K.-H., Suk J.-E., Olivera B.M., McIntosh J.M., Han K.-H.* (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 42208-42213.
130. *Mitchell S.S., Shon K.J., Foster M.P., Davis D.R., Olivera B.M., Ireland C.M.* (1998) *Biochemistry*, **37**, 1215-1220.
131. *Shon K.J., Koerber S.C., Rivier J.E., Olivera B.M., McIntosh J.M.* (1997) *Biochemistry*, **36**, 15693-15700.
132. *van Wagoner R.M., Ireland C.M.* (2003) *Biochemistry*, **42**, 6347-6352.
133. *van Wagoner R.M., Jacobsen R.B., Olivera B.M., Ireland C.M.* (2003) *Biochemistry*, **42**, 6353-6362.
134. *England L.J., Imperial J., Jacobsen R., Craig A.G., Gulyas J., Akhtar M., Rivier J., Julius D., Olivera B.M.* (1998) *Science*, **281**, 575-578.
135. *Nagasawa M., Sakimura K., Mori K.J., Bedell M.A., Copeland N.G., Jenkins N.A., Mishina M.* (1996) *Brain Res.*, **36**, 1-11.
136. *Czerwiec E., Begley G.S., Bronstein M., Stenflo J., Taylor K., Furie B.C., Furie B.* (2002) *Eur. J. Biochem.*, **269**, 6162-6172.
137. *East S.J., Garthwaite J.* (1991) *Neurosci. Lett.*, **123**, 17-19.
138. *Mena E.E., Gullak M.F., Pagnozzi M.J., Richter K.E., Rivier J., Cruz L.J., Olivera B.M.* (1990) *Neurosci. Lett.*, **118**, 241-244.

139. Klein R. (1999) *Neuropharmacology*, **38**, 1819-1829.
140. Olivera B.M., McIntosh J.M., Clark C., Middlemas D., Gray W.R., Cruz L.J. (1985) *Toxicon*, **23**, 277-282.
141. Olivera B.M., Cruz L.J., Yoshikami D. (1999) *Curr. Op. Neurobiol.*, **9**, 772-777.
142. Twede V.D., Teichert R.W., Walker C.S., Gruszczyński P., Kazmierkiewicz R., Bulaj G., Olivera B.M. (2009) *Biochemistry*, **48**, 4063-4073.
143. Jimenez E.C., Donevan S., Walker C., Zhou L.-M., Nielsen J., Cruz L.J., Armstrong H., White H.S., Olivera B.M. (2002) *Epilepsy Res.*, **51**, 73-80.
144. Gowd K.H., Twede V., Watkins M., Krishnan K.S., Teichert R.W., Bulaj G., Olivera B.M. (2008) *Toxicon*, **52**, 203-213.
145. White H.S., McCabe R.T., Armstrong H., Donevan S.D., Cruz L.J., Abogadie F.C., Torres J., Rivier J.E., Paarmann I., Hollmann M., Olivera B.M. (2000) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **292**, 425-432.
146. Miljanich G.P. (2004) *Curr. Med. Chem.*, **11**, 3029-3040.
147. Malmberg A.B., Gilbert H., McCabe R.T., Basbaum A.I. (2003) *Pain*, **101**, 109-116.
148. Williams A.J., Ling G., McCabe R.T., Tortella F.C. (2002) *Neuroreport*, **13**, 821-824.
149. Sharpe I.A., Thomas L., Loughnan M., Motin L., Palant E., Croker D.E., Alewood D., Chen S., Graham R.M., Alewood P.F., Adams D.J., Lewis R.J. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 34451-34457.
150. Bryan-Lluka L.J., Bönisch H., Lewis R.J. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 40324-40329.
151. Lean M.E.J., Mann J.I., Hoek J.A., Elliot R.M., Schofield G. (2008) *Brit. Med. J.*, **337**, a863.
152. Baskova I.P., Kostrjukova E.S., Vlasova M.A., Kharitonova O.V., Levitskiy S.A., Zavalova L.L., Moshkovskii S.A., Lazarev V.N. (2008) *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 315-320.
153. Vassilevski A.A., Kozlov S.A., Egorov T.A., Grishin E.V. (2010) *Meth. Mol. Biol.*, **615**, 87-100.
154. Dudina E.E., Korolkova Y.V., Bocharova N.E., Koshelev S.G., Egorov T.A., Huys I., Tytgat J., Grishin E.V. (2001) *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, **286**, 841-847.
155. Abbott R.T. (1967) *Notulae Naturae*, **400**, 1-8.

Поступила: 25. 05. 2011.

CONOTOXINS: FROM THE BIODIVERSITY OF GASTROPODS TO NEW DRUGS

*A.E. Fedosov<sup>1,2</sup>, S.A. Moshkovskii<sup>3</sup>, K.G. Kuznetsova<sup>3,4</sup>, B.M. Olivera<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Leninsky Pr., 33, Moscow, 119071 Russia; fax: +7 (495) 954-55-34; e-mail: fedosov\_zool@mail.ru

<sup>2</sup>Department of Biology, University of Utah, 257 South 1400 East, Rm. 201, Salt Lake City, UT 84112-0840; fax: 801-581-4668

<sup>3</sup>Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Science; ul. Pogodinskaya, 10, Moscow, 119121 Russia; fax: +7 (499) 245-08-57; e-mail: sergei.moshkovskii@ibmc.msk.ru

<sup>4</sup>Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University; 1-12 Leninskie Gory, Moscow, 119991 Russia; fax: +7 (495) 939-43-09

A review describes general trends in research of conotoxins that are peptide toxins isolated from sea gastropods of the *Conus* genus, since the toxins were discovered in 1970<sup>th</sup>. There are disclosed a conotoxin classification, their structure diversity and different ways of action to their molecular targets, mainly, ion channels. In the applied aspect of conotoxin research, drug discovery and development is discussed, the drugs being based on conotoxin structure. A first exemplary drug is a ziconotide, which is an analgesic of new generation.

**Key words:** conotoxin, conopeptide, gastropod, ion channel, drug.