

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биоорганической химии им. академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук**

*на правах рукописи*

Никольский Антон Сергеевич

**ПОЛИПЕПТИДНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ЯДА ПАУКОВ,  
МОДУЛИРУЮЩИЕ АКТИВНОСТЬ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫХ  
НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ**

Специальность 02.00.10 – Биоорганическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва – 2012

Работа выполнена в лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической  
химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

**Научный руководитель:**

доктор химических наук,  
профессор, академик РАН  
Гришин Евгений Васильевич

**Официальные оппоненты:**

доктор химических наук, профессор,  
Уткин Юрий Николаевич

доктор биологических наук,  
Тихонов Денис Борисович

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт молекулярной  
биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

Защита диссертации состоится 2012 года в часов на заседании Диссертационного  
совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки  
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
РАН по адресу 117997, ГСП-7, Москва В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М.  
Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Автореферат разослан

**Ученый секретарь Диссертационного совета,  
доктор физико-математических наук**



**В.А. Олейников**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность проблемы**

Потенциал-зависимые натриевые ( $\text{Na}^+$ ) каналы – интегральные мембранные белки, селективно пропускающие ионы  $\text{Na}^+$  и играющие ключевую роль в процессах генерации и проведения возбуждения в нервных клетках. Появление  $\text{Na}^+$  каналов в ходе эволюции животных тесно связано с дифференцировкой тканей и обособлением нервной системы. Принимающие участие в таких важнейших физиологических процессах, как осязание, чувство боли, сокращение мышц, биение сердца и многие другие,  $\text{Na}^+$  каналы представляют большой интерес для ученых всего мира, и с каждым годом актуальность их изучения только возрастает. Несмотря на усилия многих научных коллективов, пространственная структура и механизм работы  $\text{Na}^+$  каналов недостаточно изучены. Поэтому большой фундаментальный интерес представляет задача выяснить молекулярные аспекты механизма ионной проводимости и пространственную организацию этих белков.

В значительной мере современные исследования в области  $\text{Na}^+$  каналов направлены на получение новых лекарств и пестицидов, селективно взаимодействующих с каналами и модифицирующих их активность. Имея в своем распоряжении подобные молекулы, можно направленно управлять работой каналов или, например, корректировать их функционирование в патологических процессах. Поэтому поиск новых лигандов, специфичных для  $\text{Na}^+$  каналов, является важной задачей для современной медицины и биотехнологии.

$\text{Na}^+$  каналы являются мишенью для многих компонентов полипептидной природы, выделенных из различных ядовитых животных: анемонов, моллюсков, скорпионов и пауков. Именно специфичное высокоаффинное взаимодействие с некоторыми лигандами позволило идентифицировать, очистить и охарактеризовать эти мембранные белки.

С точки зрения источника новых модуляторов ионных каналов природные яды представляют наибольший интерес, поскольку являются своеобразными комбинаторными библиотеками биологически активных соединений, отобранных в ходе эволюции. Особое место среди природных ядов занимает яд пауков (в среднем, в яде паука содержится от нескольких десятков до нескольких сотен компонентов), а наиболее интересными оказываются полипептидные компоненты яда, так как они характеризуются высокой специфичностью действия. Благодаря своим свойствам эти соединения получили широкое распространение как инструменты для биохимических исследований. Использование таких молекул поможет установить точный молекулярный механизм функционирования таких сложных мембранных структур, как  $\text{Na}^+$  каналы, а также пролить свет на их фармакологические характеристики и пространственную организацию. Новые инструменты

могут быть полезны в фундаментальных исследованиях молекулярных механизмов нейросигнализации, а также найдут практическое применение в медицине для терапии заболеваний, связанных с дисфункцией  $\text{Na}^+$  каналов, и в биотехнологии как безопасные биоинсектициды.

### **Цель и задачи работы**

Цель данной работы – поиск и идентификация новых полипептидных веществ из яда пауков, модулирующих активность  $\text{Na}^+$  каналов. В соответствии с целью были поставлены следующие конкретные задачи:

1. Провести тестирование коллекции ядов пауков в отношении  $\text{Na}^+$  каналов.
2. Выделить и установить первичную структуру активных полипептидов.
3. Изучить механизм действия выделенных компонентов.
4. Осуществить поиск структурных детерминант активности новых соединений.

### **Научная новизна и практическая значимость работы**

Впервые проведен анализ яда паука *Heriades melloteei*, принадлежащего к семейству Thomisidae, на наличие полипептидов, обладающих ингибиторной активностью в отношении  $\text{Na}^+$  каналов. Обнаружены, выделены и установлены первичные структуры трех новых полипептидов (Hm-1–3). Исследована активность выделенных веществ на различные изоформы  $\text{Na}^+$  каналов.

Обнаружено новое семейство гомологичных полипептидов ( $\beta/\delta$ -агатоксины-1–7) в яде паука *Agelena orientalis*, принадлежащего к семейству Agelenidae. Эти вещества обладают уникальным потенциал-зависимым действием на  $\text{Na}^+$  каналы насекомых с одновременным влиянием на процессы активации и инактивации каналов. Подобная активность описана впервые, что может привести к пересмотру современной классификации лигандов  $\text{Na}^+$  каналов, основанной на строгом соотношении места связывания молекулы в канале и вызываемым ею эффектом.

Таким образом, полученные результаты отличаются высокой степенью новизны, расширяют наши представления о фармакологии  $\text{Na}^+$  каналов и, вероятно, будут использованы для выяснения молекулярной природы специфичности действия новых токсинов. Помимо очевидной значимости для теоретической науки, выделенные молекулы могут быть использованы в качестве основы для создания новых медицинских препаратов или же, благодаря своей специфичности действия на насекомых, найдут применение в биотехнологии как безопасные инсектициды.

### **Апробация работы**

Основные материалы диссертации были представлены на следующих конференциях и симпозиумах:

XIV Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2007» (Москва, 2007), XX зимняя международная молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2008), 16-ое собрание Европейской секции международного общества токсикологии (Лёвен, Бельгия, 2008), 12-ая международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2008), XVI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2009» (Москва, 2009), IV Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Казань, 2009), XXII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2010), 14-ая Пушинская международная школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2010), 10-е собрание Американской секции международного общества токсикологии (Сан-Хосе, Коста-Рика, 2010), 35-ый Конгресс федерации европейских биохимических обществ (Гётеборг, Швеция, 2010), Ежегодный симпозиум биохимического общества «Последние достижения биохимии мембран» (Кэмбридж, Великобритания, 2011), V Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Петрозаводск, 2011).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 16 печатных работ.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа изложена на \_\_\_\_\_ страницах, содержит \_\_\_\_ рисунков и \_\_\_\_ таблиц, имеет традиционную структуру и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы, включающего \_\_\_\_\_ источников.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Стратегия и объекты исследования

Для поиска новых веществ из яда пауков была использована стандартная стратегия, когда образцы ядов на каждом этапе исследования тестировались в системе, где можно непосредственно наблюдать и измерять эффекты интересующего нас вещества на выбранной молекулярной мишени. Такой подход зарекомендовал себя как надежный, дающий достоверные и проверяемые результаты. Цельные яды пауков приобретались в виде лиофилизованного порошка у Fauna Laboratories, Алматы, Республика Казахстан, и хранились при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Инсектотоксичность ядов и выделенных индивидуальных веществ тестировались на личинках мясной мухи *Sarcophaga carnaria*. Все электрофизиологические эксперименты проводились в лаборатории токсикологии Католического Университета г. Лёвен, Бельгия. На первом этапе исследования было проведено тестирование ядов 16 видов пауков, принадлежащих к 9 различным семействам, на наличие ингибирующей активности в отношении потенциал-зависимых  $\text{Na}^+$  каналов млекопитающих. В качестве мишеней использовались 3 изоформы  $\text{Na}^+$  каналов – тетродотоксин-чувствительные  $\text{Na}_v1.2$ ,  $\text{Na}_v1.7$  и тетродотоксин-устойчивая  $\text{Na}_v1.5$ , гены которых были экспрессированы в ооцитах *Xenopus laevis*. Измерения токов проводились по методу двухэлектродной фиксации потенциалов. Результаты тестирования приведены в таблице 1.

**Таблица 1. Тестирование активности цельных ядов пауков.** Приведены значения относительного (в %) снижения амплитуды  $\text{Na}^+$  токов, опосредованных различными каналами, при действии яда в концентрации 0,1 мг/мл. (-) – тестирование не проводилось; (†) – наблюдался лизис ооцитов. Префикс r обозначает изоформы из *Rattus norvegicus*, h – из человека.

Семейство	Вид	r $\text{Na}_v1.2$	h $\text{Na}_v1.5$	r $\text{Na}_v1.7$
Agelenidae	<i>Agelena orientalis</i>	9	3	9
Eresidae	<i>Eresus</i> sp.	-	34	17
	<i>Stegodyphus</i> sp.	26	52	-
Gnaphosidae	<i>Drassodes</i> sp.	33	71	35
Lycosidae	<i>Alopecosa</i> sp.	†	†	†
	<i>Desertosa</i> sp.	†	†	†
	<i>Geolycosa</i> sp.	†	†	†
	<i>Hippocosa</i> sp.	†	†	†
	<i>Lycosa singoriensis</i>	†	†	†
	<i>Nenilinia</i> sp.	†	†	†
Miturgidae	<i>Cheiracanthium punctorium</i>	†	†	†
Philodromidae	<i>Tibellus oblongus</i>	47	53	9
Theridiidae	<i>Latrodectus dahli</i>	6	36	8
Thomisidae	<i>Heriaeus melloteei</i>	87	81	80
	<i>Misumena vatia</i>	69	36	100
Zodariidae	<i>Lachesana tarabaevi</i>	†	†	†

Некоторые яды, как видно из представленной таблицы, проявляли выраженные цитолитические свойства, в результате чего в процессе эксперимента наблюдался лизис ооцитов, что приводило к невозможности дальнейших измерений. Так, например, ранее в лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН был установлен молекулярный состав яда паука *Lachesana tarabaevi*, который является богатым источником цитолитических и антимикробных пептидов (латарцинов и цито-инсектотоксинов). Подобные трудности могут быть решены более сильным разведением указанных ядов, поскольку действующие концентрации нейротоксинов и цитолитических пептидов обычно различаются на порядки, или же предварительным разделением ядов на фракции с последующим тестированием.

В результате проведенного тестирования было обнаружено, что яды двух пауков *Heriades melloteei* и *Misumena vatia*, принадлежащих к одному семейству Thomisidae, обладают наиболее выраженным ингибирующим эффектом. На основании того, что природными жертвами пауков являются насекомые, была оценена инсектицидная активность указанных ядов. Было показано, что яд *H. melloteei* в дозе  $\geq 15$  мг/кг вызывал немедленный паралич и смерть личинок *S. carnaria*. Такая величина минимальной эффективной дозы говорит о присутствии инсектицидных компонентов в яде этих пауков. Для дальнейшей работы был выбран яд *H. melloteei*, поскольку он показал наибольшую активность.

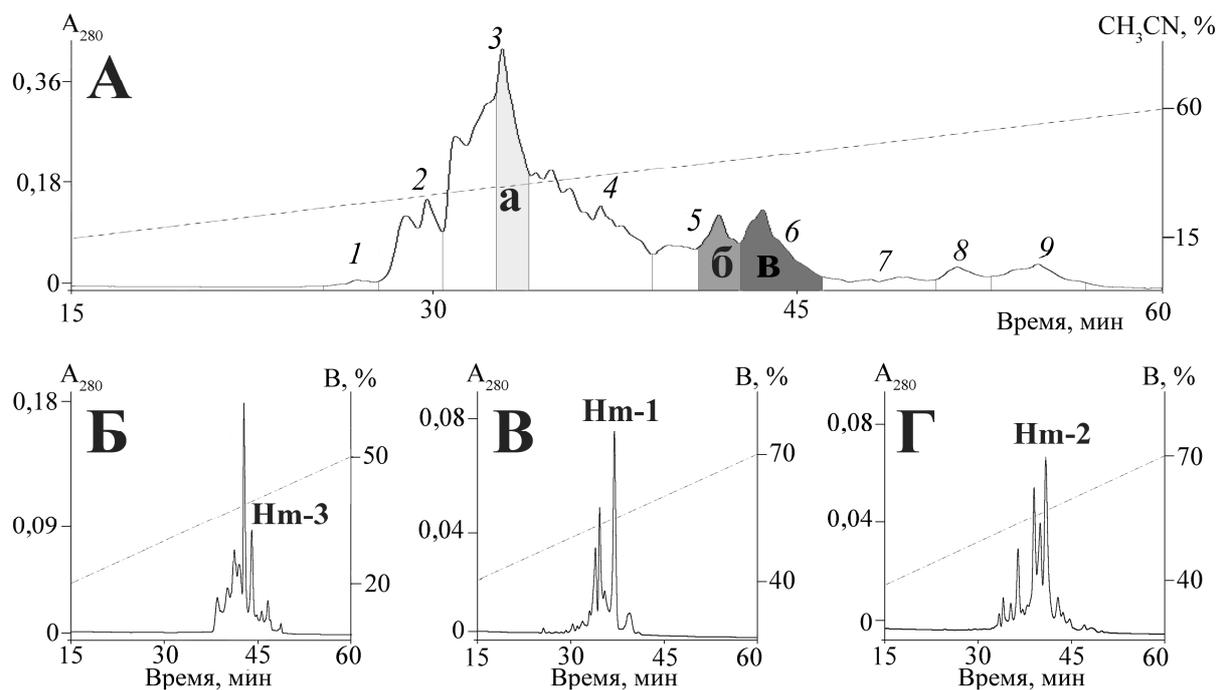
Яд паука *Agelena orientalis* оказывает высокую токсичность на насекомых. Например, смертельной дозой для личинок мясной мухи является  $\sim 6$  мг/кг. Цельный яд в концентрации 0,1 мг/мл вызывает ярко выраженный эффект на  $\text{Na}^+$  каналы  $\text{DmNa}_v1$  дрозофилы (облегчение активации и ингибирование инактивации), в то же время никак не воздействует на каналы  $\text{Na}_v1.2$ , 1.5 или 1.7 млекопитающих (табл. 1). По причине столь высокой токсичности и избирательности действия яд *A. orientalis* был исследован для поиска новых селективных веществ, воздействующих на  $\text{Na}^+$  каналы насекомых.

### **Выделение активных молекул**

С целью получения новых блокаторов  $\text{Na}^+$  каналов была использована стратегия многоступенчатого разделения цельного яда *H. melloteei* методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ). Такой подход позволяет получить искомые компоненты в индивидуальном виде за минимальное число стадий и с минимальными потерями, что является решающим фактором при работе с ограниченным количеством биологического материала. На всех стадиях разделения яда фракции подвергались тестированию на наличие искомой активности. Для этого отбирались аликваты

так, чтобы концентрация активного компонента при тестировании сохранялась. На рисунке 1А показан профиль первой стадии разделения яда.

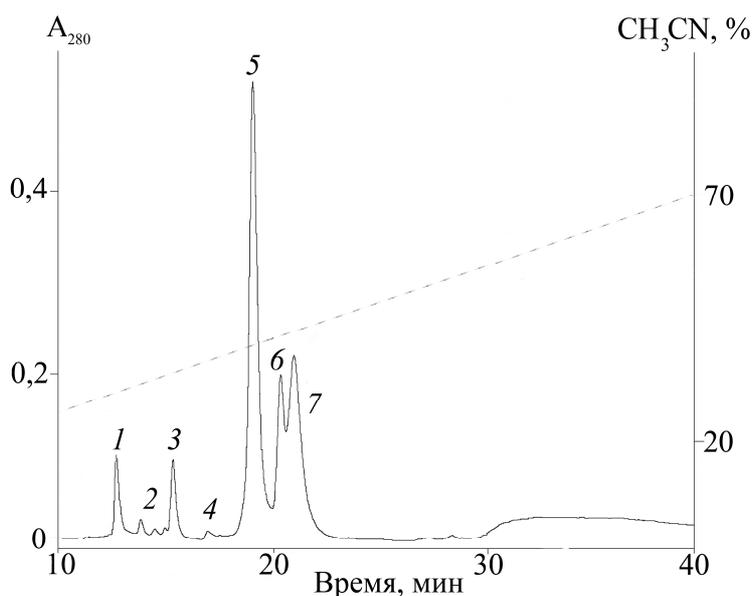
**Рисунок 1. Выделение блокаторов  $\text{Na}^+$  каналов из яда паука *Heriades melloteei*.** (А) Разделение 4 мг цельного яда на колонке Jupiter C<sub>5</sub> (4,6×150 мм, Phenomenex, США) в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте (указан пунктиром) со скоростью элюции 1 мл/мин. Цифрами обозначены фракции, для которых проводилось тестирование инсектицидной активности. (Б, В, Г) Второй этап разделения активных фракций **а** (Б), **б** (В), **в** (Г) на колонке Luna C<sub>8</sub> (4,6×150 мм, Phenomenex, США) в градиенте концентрации элюента (50% ацетонитрил, 20% изопропанол в 0,1% трифторуксусной кислоте; указан пунктиром) со скоростью элюции 1 мл/мин. Фракции, содержащие активные компоненты, обозначены (Нм-1, Нм-2 и Нм-3).



Блокирующая активность в отношении  $\text{Na}^+$  каналов млекопитающих (изоформы  $\text{Na}_v1.2$  и  $\text{Na}_v1.5$ ) была обнаружена во фракциях 3–6, в то время как инсектицидную активность проявляли фракции 2–6. Таким образом, наблюдается перекрывание профилей активности, что может быть связано с эффектом одних и тех же соединений. Активные фракции по данным МАЛДИ (матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации) масс-спектрометрии содержали компоненты с молекулярной массой 3–10 кДа, что соответствует массам наиболее часто встречаемых пептидов из яда пауков. Для дальнейшей работы были выбраны фракции 3, 5 и 6, а впоследствии предполагается также изучить активные компоненты фракций 2 и 4. В результате второй стадии ОФ-ВЭЖХ были выделены блокаторы  $\text{Na}^+$  каналов, получившие название Нм-1, 2 и 3 (рис. 1Б, В и Г). Для получения этих веществ в индивидуальном виде использовалась третья стадия хроматографического разделения. Чистота выделенных соединений подтверждена аналитической ОФ-ВЭЖХ, а

также с помощью МАЛДИ масс-спектрометрии. Измеренные средние молекулярные массы токсинов составили 4171,9 Да (Нм-1), 4555,3 Да (Нм-2) и 3907,7 Да (Нм-3).

Активные вещества из цельного яда *A. orientalis* были выделены также с помощью процедуры многостадийной ОФ-ВЭЖХ. На первой стадии яд подвергался разделению в основных условиях (рис. 2), а на второй полученные фракции хроматографировались в кислых условиях. В итоге были получены семь новых полипептидов, получивших название  $\beta/\delta$ -агатоксины.



**Рисунок 2. Выделение активных компонентов из яда паука *Agelena orientalis*, действующих на  $\text{Na}^+$  каналы.** ОФ-ВЭЖХ 1 мг цельного яда *A. orientalis* на колонке Jupiter C<sub>5</sub> (4,6×150 мм) в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1% триэтиламине (показан пунктиром). Пронумерованные фракции содержат токсины, активные в отношении  $\text{Na}^+$  каналов насекомых: 1 –  $\beta/\delta$ -ага-5, 2 –  $\beta/\delta$ -ага-4, 3 –  $\beta/\delta$ -ага-6, 4 –  $\beta/\delta$ -ага-7, 5 –  $\beta/\delta$ -ага-1, 6 –  $\beta/\delta$ -ага-2, 7 –  $\beta/\delta$ -ага-3.

Гомогенность полученных компонентов проверялась с помощью аналитической ОФ-ВЭЖХ и МАЛДИ масс-спектрометрии. Самый мажорный компонент цельного яда составляет около 30% от всего полипептидного состава, проявляет высокую токсичность ( $\text{LD}_{50} = 7$  мг/кг для личинок мясной мухи) и был назван  $\beta/\delta$ -агатоксин-1 ( $\beta/\delta$ -ага-1). Остальные шесть пептидов были пронумерованы в соответствии с их сходством с  $\beta/\delta$ -ага-1 (см. ниже табл. 3). Высокая инсектотоксичность делает  $\beta/\delta$ -агатоксины перспективными объектами для использования в биотехнологии в качестве пестицидов.

### Структурный анализ и поиск гомологов новых полипептидов

При определении первичных структур выделенных полипептидов использовались классические приемы белковой химии, включающие хроматографические методы, масс-спектрометрию, автоматическое секвенирование по Эдману и в отдельных случаях фрагментацию полипептидной цепи. Для установления аминокислотных последовательностей новых токсинов были проведены реакции восстановления

дисульфидных связей с последующим алкилированием 4-винилпиридином высвободившихся тиольных групп.

Полные аминокислотные последовательности блокаторов Na<sup>+</sup> каналов из *H. melloteei* (табл. 2) были установлены с помощью перечисленных выше методов, включая селективную фрагментацию по остаткам метионина (бромцианом) и глутаминовой кислоты (эндопротеиназой Glu-C). На первом этапе устанавливались частичные N-концевые последовательности полипептидов, после чего они подвергались селективному расщеплению. Полученные фрагменты разделяли с помощью ОФ-ВЭЖХ, измеряли их массу, а затем секвенировали. В результате получали набор последовательностей, которые однозначно и полностью соответствовали исходным полипептидам. Из-за разницы измеренных молекулярных масс токсина Hm-1 и его С-концевых фрагментов и соответствующих расчетных значений по данным секвенирования ( $\Delta = 1$  Да) был сделан вывод о наличии у этого пептида посттрансляционной модификации – С-концевого амидирования.

**Таблица 2. Аминокислотные последовательности блокаторов Na<sup>+</sup> каналов из яда паука *Heriaeus melloteei*.** Жирным шрифтом выделены остатки глутаминовой кислоты и метионина, остатки цистеина выделены затемнением. Разрывы внесены для оптимизации сравнения последовательностей.

Токсин	Аминокислотная последовательность				Длина, а.о.
	1	10	20	30	
Hm-1	G	<b>C</b> IPYGKT <b>C</b> EFWSGPW <b>C</b> CAGK- <b>C</b> KLNVWS <b>M</b> TL <b>S</b> CTRN <b>F</b> -NH <sub>2</sub>			37
Hm-2	G	<b>C</b> IP <b>S</b> FG <b>E</b> CAWFS <b>G</b> ES <b>C</b> CTGI- <b>C</b> KWVFFTSK <b>F</b> <b>M</b> CRRVWGKD-OH			40
Hm-3	G	<b>C</b> IAKN <b>K</b> ESCAWFS <b>G</b> EW <b>C</b> CGALS <b>C</b> KYSIKRNLK <b>I</b> CV-OH			35

Все выделенные полипептиды содержат по 35–40 аминокислотных остатков (а.о.), шесть из которых являются остатками цистеина, образующими три внутримолекулярные дисульфидные связи. Порядок замыкания этих связей не исследовался. Расположение остатков цистеина в аминокислотной последовательности позволяет предположить формирование пространственной укладки типа «цистинового узла» у найденных молекул, характерной для многих других пептидных токсинов пауков (см. ниже рис. 3). Подобный тип укладки является довольно общим и распространенным в мире токсинов, однако не определяет биологические свойства молекулы.

При анализе Hm-2 и 3 для них не было найдено ни одной сходной последовательности в базе данных UniProt (<http://www.uniprot.org/>), но они показали некоторую степень сходства между собой (46% идентичных остатков). Для Hm-1 обнаружена низкая степень сходства с

уже известными пептидами агеленином и  $\mu$ -агатоксином 2, выделенными из яда пауков и активными в отношении потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Na}^+$  каналов, соответственно (рис. 3). Отсутствие значимого сходства с другими токсинами позволяет нам говорить об отнесении этих молекул к новым группам блокаторов  $\text{Na}^+$  каналов.

**Рисунок 3. Сравнение аминокислотной последовательности Hm-1 с известными пептидами.** Заштрихованы идентичные аминокислотные остатки. Справа приведено процентное содержание остатков, идентичных с Hm-1.

	1	10	20	30	
Hm-1	-	█	█	█	█
агеленин	GGCLPHNRFCNALSGPRCCSGLKCKELSIWDSR-CL---	█	█	█	40
$\mu$ -агатоксин 2	-ECATKNKRCADWAGPWCCDGLYCSCRSPYGCMM-CRPSS	█	█	█	32

Полную аминокислотную последовательность полипептидов из яда *A. orientalis* устанавливали с помощью автоматической деградации по Эдману. N-концевое секвенирование восстановленных и алкилированных полипептидов показало, что  $\beta/\delta$ -ага-5 и 6 имеют по 36 а.о.,  $\beta/\delta$ -ага-3, 4 и 7 – 37 а.о., а  $\beta/\delta$ -ага-1 и 2 – 38 а.о. (табл. 3). Каждая молекула токсинов содержит 8 остатков цистеина, которые образуют четыре внутримолекулярные дисульфидные связи. Из-за разницы в 1 Да между измеренной и вычисленной на основании аминокислотной последовательности молекулярными массами, был сделан вывод, что все семь полипептидов имеют C-концевое амидирование.

Аминокислотные последовательности  $\beta/\delta$ -агатоксинов показывают значительное сходство с другими известными токсинами, такими как  $\mu$ -агатоксины из паука *Agelenopsis aperta*, куртатоксины из *Hololena curta* и  $\delta$ -палутоксины из *Paracoelotes luctuosus*. Все эти токсины образуют большое семейство родственных полипептидов, действующих на  $\text{Na}^+$  каналы насекомых. К настоящему времени пространственные структуры разрешены только для двух представителей –  $\mu$ -агатоксина-1 и  $\delta$ -палутоксина-2, формирующих наиболее общий мотив укладки для токсинов пауков – «цистиновый узел». Даже при отсутствии прямых экспериментальных данных о расположении дисульфидных связей  $\beta/\delta$ -агатоксинов разумно предполагать, что они формируют в пространстве аналогичный тип укладки (см. ниже, рис. 9).

**Таблица 3. Аминокислотные последовательности  $\beta/\delta$ -агатоксинов.** Разрывы внесены для оптимизации сравнения последовательностей. Серым выделены а.о., отличные от  $\beta/\delta$ -агатоксина-1. Все молекулы имеют С-концевое амидирование. Остатки цистеина выделены жирным шрифтом.

Токсин	Аминокислотная последовательность				Молекулярная масса, Да
	1	10	20	30	
$\beta/\delta$ -ara-1	GDC <b>CV</b> GESQ <b>Q</b> CADWSGPY <b>CC</b> KGYY <b>CT</b> CRYFPK <b>CI</b> CVNDN-NH <sub>2</sub>				4271,8
$\beta/\delta$ -ara-2	GG <b>CV</b> GESQ <b>Q</b> CADWSGPY <b>CC</b> KGYY <b>CT</b> CRYFPK <b>CI</b> CVNDN-NH <sub>2</sub>				4213,8
$\beta/\delta$ -ara-3	G <b>CV</b> GEN <b>Q</b> Q <b>C</b> ADWAG <b>PH</b> <b>CC</b> SGYY <b>CT</b> CRYFPK <b>CI</b> CRKDS-NH <sub>2</sub>				4144,7
$\beta/\delta$ -ara-4	G <b>CV</b> GEN <b>Q</b> Q <b>C</b> ADWAG <b>LH</b> <b>CC</b> SGYY <b>CT</b> CRYFPK <b>CI</b> CRKDS-NH <sub>2</sub>				4160,8
$\beta/\delta$ -ara-5	- <b>D</b> CVGEN <b>GR</b> CRDWYN-D <b>CC</b> DGFY <b>CS</b> CR <b>Q</b> PPY <b>CI</b> CRNNN-NH <sub>2</sub>				4234,7
$\beta/\delta$ -ara-6	- <b>E</b> CVGEN <b>GH</b> CRSWYN-D <b>CC</b> DGY <b>CS</b> CM <b>Q</b> PP <b>NC</b> ICRNNN-NH <sub>2</sub>				4143,6
$\beta/\delta$ -ara-7	- <b>E</b> CAAK <b>NR</b> CADWAG <b>PW</b> <b>CC</b> EGLY <b>CS</b> CRSY <b>PG</b> CMCRPNS-NH <sub>2</sub>				4111,8

### Механизм действия выделенных токсинов

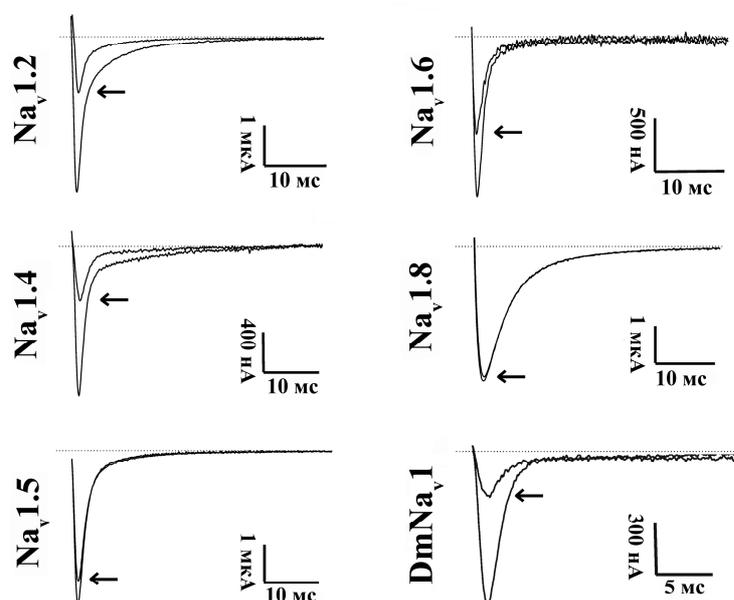
Испытания активности цельных ядов, отдельных фракций и очищенных компонентов проводились на ооцитах *X. laevis* методом двухэлектродной фиксации потенциала. Предварительно в ооциты вводилась кэпированная матричная РНК, кодирующая  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы различных изоформ Na<sup>+</sup> каналов млекопитающих или дрозофилы.

Было обнаружено, что при аппликации токсинов Nm-1, 2 и 3 в концентрациях ~100 нМ происходило уменьшение амплитуды Na<sup>+</sup> тока. Например, в отношении мышечного типа каналов (изоформа Na<sub>v</sub>1.4) были получены кривые «доза-ответ», определены эффективные концентрации токсинов, при которых наблюдается 50%-ное снижение амплитуды Na<sup>+</sup> тока (EC<sub>50</sub>), составившие ~340 нМ для Nm-1 (коэффициент Хилла 1,0±0,1) и ~160 нМ для Nm-2 (коэффициент Хилла 1,2±0,1). Достаточно низкие действующие концентрации токсинов позволяют предположить, что главной мишенью для них являются Na<sup>+</sup> каналы.

В отличие от большинства полипептидных лигандов, в случае Nm-1 и 2 не происходило изменений вольт-амперных характеристик, кинетики активации и инактивации Na<sup>+</sup> каналов. Таким образом, эти токсины являются, по-видимому, типичными поровыми блокаторами. Предполагается, что Nm-1 и 2 взаимодействуют с теми же областями канала, что и классические блокаторы тетродотоксин и сакситоксин (т.н. сайт 1), или близкими к ним.

Nm-1 и 2 не проявляют выраженной специфичности в отношении различных изоформ Na<sup>+</sup> каналов. На рисунке 4 показаны записи Na<sup>+</sup> токов на фоне приложения токсина Nm-2.

Видно, что этот полипептид наиболее активен в отношении каналов насекомых, а также изоформ каналов млекопитающих  $Na_v1.2$  и  $Na_v1.4$ , и наименее активен на  $Na_v1.5$  и  $Na_v1.8$ .

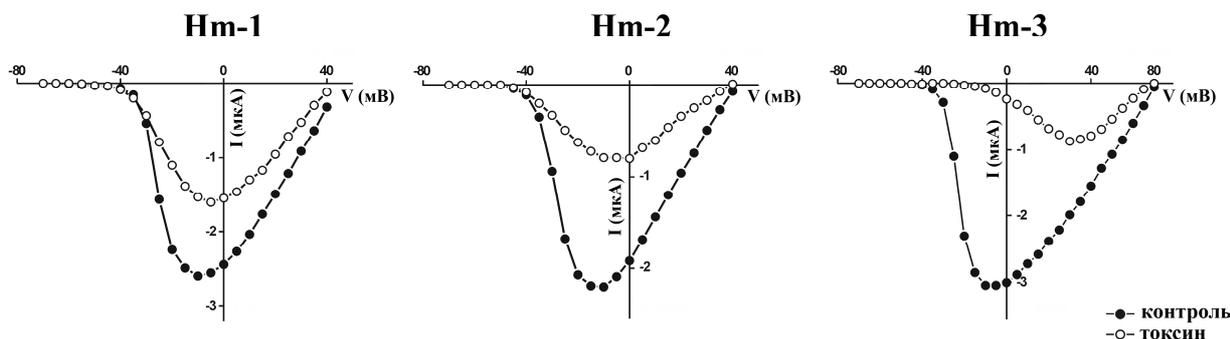


**Рисунок 4. Эффекты Hm-2 на различные изоформы потенциал-зависимых  $Na^+$  каналов.** Изоформы  $rNa_v1.2$ ,  $rNa_v1.4$  и  $rNa_v1.8$  из *R. norvegicus*,  $hNa_v1.5$  из человека,  $mNa_v1.6$  из *Mus musculus* и  $DmNa_v1$  из *Drosophila melanogaster* экспрессировались в ооцитах *X. laevis*. Стрелкой указана пиковая амплитуда  $Na^+$  тока на фоне приложения токсина в концентрации 200 нМ.

Hm-3, несмотря на значительное сходство по аминокислотной последовательности с Hm-2 (46% идентичных остатков), характеризуется иным механизмом действия. На рисунке 5 заметны отчетливый сдвиг вольт-амперной характеристики канала при действии этого токсина и отсутствие такого эффекта в случае Hm-1 и 2. Подобный эффект обнаружен у токсинов JZTX-III из яда паука *Chilobrachys jingzhao* и ProTx-I и II из яда паука *Thrixopelma pruriens*, предположительно действующих на т.н. рецепторный сайт 4. По-видимому, Hm-3 также связывается с сайтом 4. Стоит отметить, что классическими модуляторами  $Na^+$  каналов, действующими через сайт 4, являются  $\beta$ -токсины скорпионов. Характер их действия, однако, отличается: процесс активации не ингибируется, а напротив, облегчается. Сходным образом действуют  $\mu$ -агатоксины из яда паука *A. aperta* и Magi 5 из яда паука *Macrothele gigas*.  $\delta$ -Палутоксины из яда паука *P. luctuosus* взаимодействуют с сайтом 4, однако по физиологическому эффекту сходны с  $\alpha$ -токсинами скорпионов, воздействующими на сайт 3.

Таким образом, наблюдается широкое разнообразие фармакологической активности полипептидных модуляторов  $Na^+$  каналов. При этом молекулы, связывающиеся со сходными участками канального белка, могут оказывать различное влияние на его активность и наоборот, полипептиды, взаимодействующие с различными рецепторными сайтами, могут производить сходный физиологический эффект.

**Рисунок 5. Изменение вольт-амперной характеристики мышечной изоформы  $\text{Na}^+$  канала ( $\text{rNa}_v1.4$ ) при действии токсинов. ● – контроль, ○ – при действии токсинов: Hm-1 (200 нМ), Hm-2 (200 нМ) и Hm-3 (1  $\mu\text{M}$ ).**

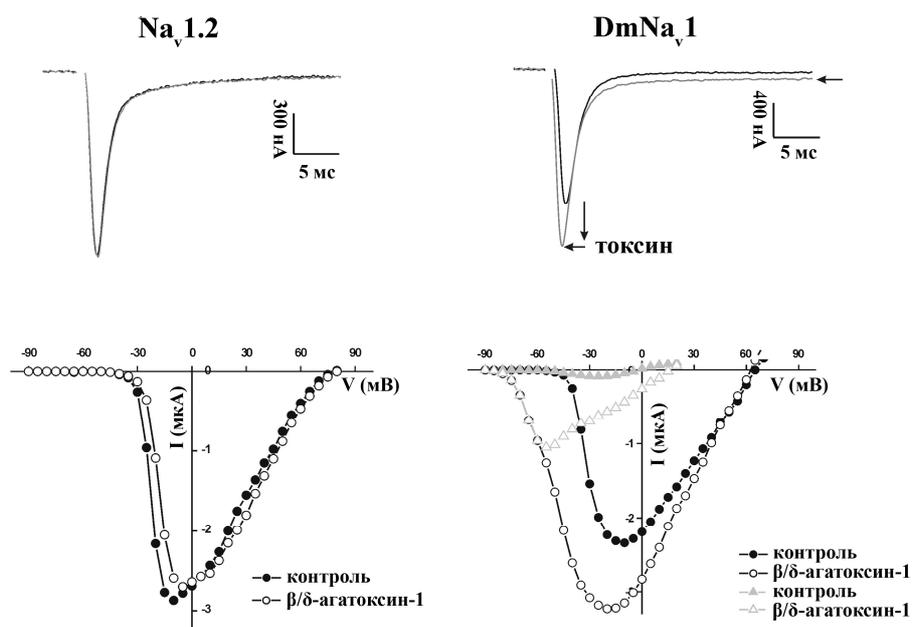


При исследовании функциональной активности компонентов яда *A. orientalis* в первую очередь испытанию подвергли  $\beta/\delta$ -ага-1 как самый мажорный компонент яда. Запись токов при приложении 1 мкМ  $\beta/\delta$ -ага-1 производилась при деполяризации мембраны до -10 мВ (при этом значении амплитуда тока максимальна). В результате было отмечено три различимых эффекта (рис. 6). Первый связан с увеличением пиковой амплитуды тока на ~35%, второй с уменьшением времени достижения максимальной амплитуды тока с ~1,1 до 0,9 мс, третий с появлением неинaktivированной компоненты тока величиной ~5% от пиковой амплитуды после реполяризации.

Все три эффекта хорошо прослеживаются на вольт-амперной характеристике канала  $\text{DmNa}_v1$ , полученной при деполяризации мембраны от -80 мВ до 60 мВ с шагом 5 мВ. Каждое значение силы тока при определенном значении мембранного потенциала записывали и откладывали на графике зависимости  $\text{Na}^+$  тока от потенциала активации канала. Также измерялся ток спустя 50 мс с начала деполяризации для отслеживания воздействия токсина на инактивацию канала. Как видно из рисунка 6,  $\beta/\delta$ -ага-1 вызывает сильный сдвиг порогового потенциала активации в более гиперполяризованную область мембранного потенциала. Т.е.  $\text{Na}^+$  каналы активируются при более низких значениях мембранного потенциала (максимальный ток наблюдали при потенциале активации -35 мВ), а действие  $\beta/\delta$ -ага-1 характеризуется облегчением процесса активации ( $\text{EC}_{50}$  ~290 нМ, коэффициент Хилла  $1,5 \pm 0,7$ ). Амплитуда тока, измеренного спустя 50 мс, зависит от потенциала активации, и эти остаточные токи возникают только в диапазоне от -80 до 10 мВ. Так, максимальная амплитуда этого тока составляет ~20% от значения амплитуды быстрой компоненты тока при потенциале активации -45 мВ. Т.е. некоторые каналы еще остаются открытыми спустя время, значительно большее нормального времени их работы, не переходя в инактивированное состояние (значение  $\text{EC}_{50}$  ~220 нМ, коэффициент Хилла  $1,5 \pm 0,4$ ). При

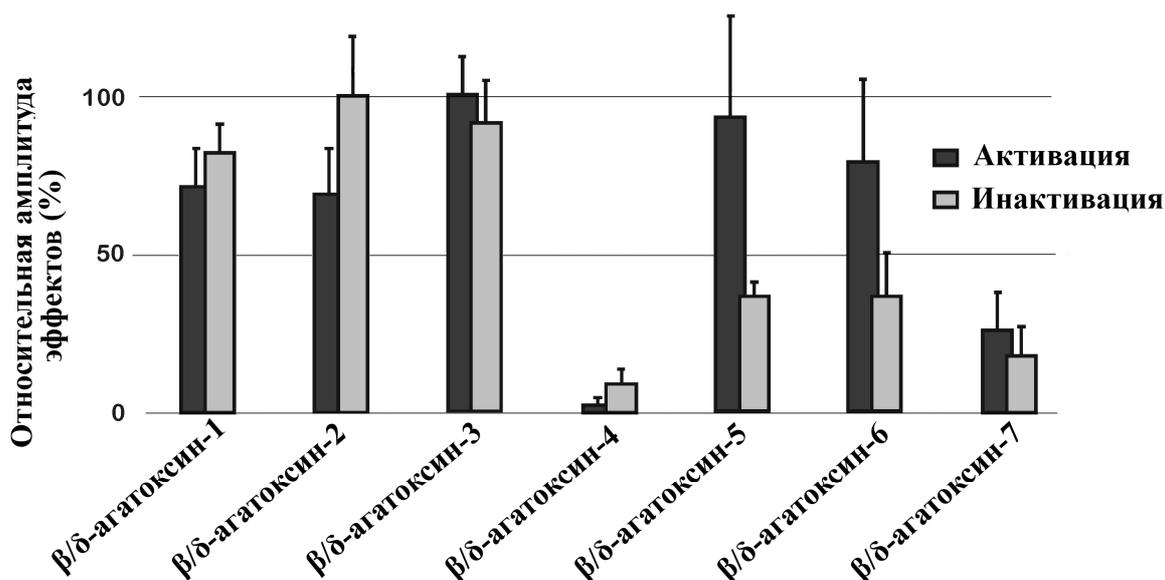
этом  $\beta/\delta$ -ага-1 не проявляет никакого эффекта на  $\text{Na}^+$  каналы млекопитающих при концентрации 1 мкМ (на рисунке 6 приведены данные для  $\text{rNa}_v1.2$  крысы *R. norvegicus*).

**Рисунок 6.** Эффекты  $\beta/\delta$ -ага-1 на  $\text{Na}^+$  каналы  $\text{DmNa}_v1$  и  $\text{rNa}_v1.2$ , экспрессируемые в ооцитах *Xenopus laevis*. В верхнем ряду представлены записи токов в контроле (черный график) и при приложении 1 мкМ  $\beta/\delta$ -ага-1 (серый график). В нижнем ряду представлена вольт-амперная характеристика для быстрой компоненты тока в контроле (черные кружочки) и в присутствии 1 мкМ  $\beta/\delta$ -ага-1 (белые кружочки). Измерение тока проводилось также спустя 50 мс после деполяризации (серые треугольники для контроля и белые для 1 мкМ  $\beta/\delta$ -ага-1).



Проводился также анализ функциональной активности шести других токсинов, выделенных из яда *A. orientalis* и характеризующихся высоким сходством с  $\beta/\delta$ -ага-1 ( $\beta/\delta$ -агатооксины-2–7). Для исследования вольт-амперных характеристик канала использовался описанный выше протокол. Измерение максимальных токов осуществлялось при потенциале активации -35 мВ, а остаточных токов – -45 мВ спустя 50 мс. Полученные данные свидетельствуют о том, что все полипептиды действуют схожим с  $\beta/\delta$ -ага-1 образом. На рисунке 7 представлены эффекты для каждого токсина, нормализованные относительно максимальных значений.

**Рисунок 7. Относительные величины эффектов  $\beta/\delta$ -агатовксинов на активацию и инактивацию  $\text{Na}^+$  каналов  $\text{DmNa}_v1$ .** Концентрация токсинов 1 мкМ. Амплитуда наибольшего наблюдаемого тока принята за 100%.



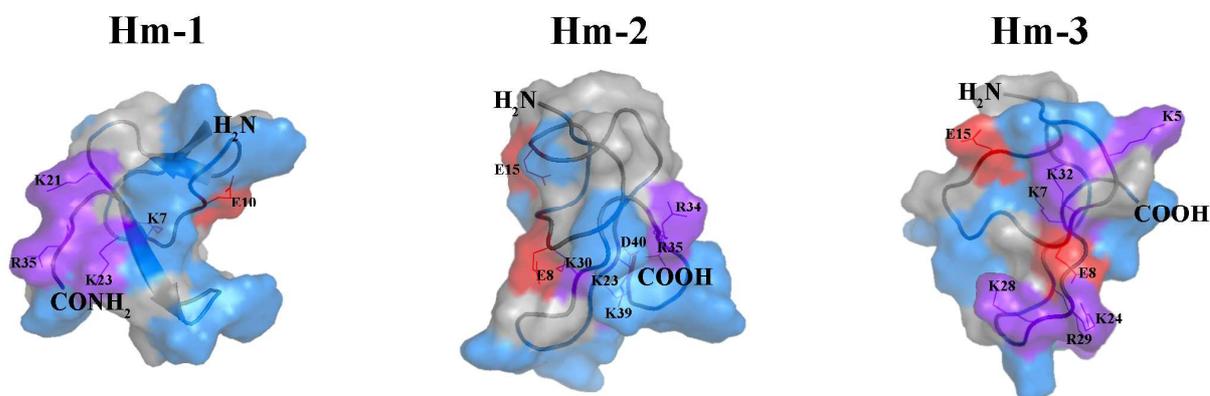
### Поиск структурных детерминант активности новых полипептидов

Установление пространственной организации молекулы позволило бы выявить некоторые ее структурные особенности и предположить вероятный механизм действия на мишень. Для всех изученных молекул пространственная структура пока не исследована. Однако с помощью компьютерных методов представляется возможным построить модели их пространственной организации на основе сходства с токсинами, для которых 3D структура уже разрешена. Молекулярное моделирование проводилось с использованием программы MODELLER на основе ранее известной структуры близкого аналога. Далее все модели проверялись программой TINKER с минимизацией свободной энергии молекулы в силовом поле CHARMM27.

Гомологичное моделирование Nm-1, 2 и 3 проводилось на основе структуры агеленина – токсина, действующего на  $\text{Ca}^{2+}$  каналы (рис. 8). Отличительной особенностью токсинов Nm-1 и Nm-2 является высокое содержание остатков ароматических аминокислот, которые возможно ответственны за связывание данных соединений с канальным белком. Похожая ситуация, по-видимому, имеет место и у хайнантоксина-1 – блокатора  $\text{Na}^+$  каналов: остатки Phe, Tyr, Trp, а также Val формируют гидрофобные кластеры. Такие области предположительно действуют как якорь при связывании токсинов с каналом. Расположение заряженных остатков может указывать на вероятный механизм действия токсинов. Так, у Nm-1 три положительно заряженных остатка (Lys-21, Lys-23 и Arg-35) из четырех сближены, а единственный остаток, несущий отрицательный заряд (Glu-10), вероятно образует ионную пару с N-концевой аминогруппой молекулы. В случае Nm-2 остатки положительно

заряженных аминокислот (Lys-23, Lys-30, Arg-34, Arg-35 и Lys-39) сконцентрированы на одном полюсе молекулы. Такое распределение зарядов характерно и ожидаемо для токсинов, являющихся поровыми блокаторами. Напротив, у Hm-3, являющегося модулятором активации и предположительно взаимодействующего с рецепторным сайтом 4, не наблюдается выраженной асимметрии распределения зарядов.

**Рисунок 8. Модели пространственной структуры полипептидов Hm-1, 2 и 3.** Модели построены на основе структуры агеленина (код PDB 2E2S). Боковые радикалы заряженных а.о. показаны линиями. Обозначены N- и C-концы основной цепи. Воображаемая поверхность молекул раскрашена: красным обозначены отрицательно заряженные остатки, фиолетовым – положительно заряженные, синим – гидрофобные, серым – прочие.



Высокое сходство между аминокислотными последовательностями полипептидов обычно подразумевает общность пространственной организации (такое сходство наблюдается, например, у  $\mu$ -ага-1 и  $\delta$ -палутоксинов-1 и 2, для которых известна пространственная структура) и механизмов действия, хотя и существует достаточное количество исключений. В рамках данной работы мы можем предположить, что  $\beta/\delta$ - и  $\mu$ -агатоксины, а также куртатоксины и  $\delta$ -палутоксины (рис. 9) составляют крупное семейство родственных полипептидов, имеют общий тип укладки и связываются с рецепторным сайтом 4  $\text{Na}^+$  каналов насекомых.

Для  $\mu$ -агатоксинов, которые были выделены первыми из яда *A. aperta*, показано, что они специфично действуют на  $\text{Na}^+$  каналы насекомых. Для наиболее изученных  $\mu$ -ага-1 и 4 обнаружено, что они сдвигают активационную кривую каналов в область более отрицательных значений потенциала, сродни  $\beta$ -токсинам скорпионов. Кроме того, для них было показано замедление процесса инактивации  $\text{Na}^+$  каналов и возникновение неинактивируемого тока. Эти эффекты не были подробно изучены, но, по крайней мере, для  $\mu$ -ага-1 и 4 можно сказать, что они качественно похожи на токсины, описанные нами. Мы полагаем, что префикс « $\mu$ -» не подходит для обозначения этих токсинов, поскольку обычно применяется для названия поровых блокаторов  $\text{Na}^+$  каналов;  $\mu$ -агатоксины следует

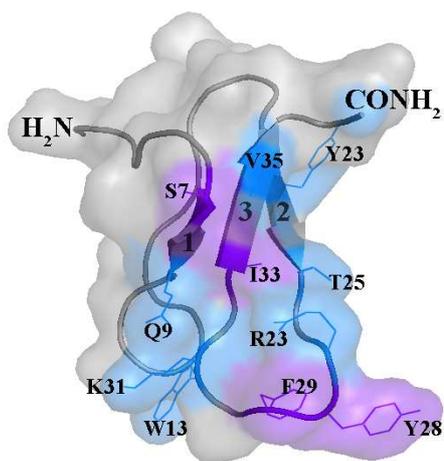
переименовать в соответствии с проявляемыми ими эффектами. Куртатоксины из яда *H. curta* не изучены подробно, однако, по-видимому, действуют схожим образом с другими членами семейства.

**Рисунок 9. Сравнение аминокислотных последовательностей  $\beta/\delta$ -ага-1 с известными токсинами.** Светло-серым выделены идентичные с  $\beta/\delta$ -ага-1 а.о., темно-серым – остатки цистеина, жирным – остатки, по-видимому, ответственные за  $\beta$ -эффект, подчеркнуты функционально значимые остатки  $\delta$ -палутоксина-2.

	1	10	20	30	
$\beta/\delta$ -агатоксин-1	GDCVGE	SQQCADWS	GPYCC	KGYICTCRYF	PKCICVNDN
$\mu$ -агатоксин-1	-ECVPEN	GHCRD	WYDE-	CCEGFYC	SCRQPPKICRN
$\mu$ -агатоксин-4	A-CVGEN	QQCADW	AGPHCCD	GYYICTCRYF	PKCICRN
куртатоксин-1	S-CVGE	YGRCS	AYED-	CCDGYYC	NCSQPPYCLCR
куртатоксин-2	ADCVGD	GQRCADW	AGPYCC	SGYYC	SCRSMFYCR
куртатоксин-3	ADCVGD	GQKCADW	FPGPYCC	SGYYC	SCRSMFYCR
$\delta$ -палутоксин-1	G-CLGEGE	KCADWS	GPSCCD	GFYC	SCRSMFYCR
$\delta$ -палутоксин-2	A-CVGD	GQRCAS	WSGPYCC	DGYC	SCRSMFYCR
$\delta$ -палутоксин-3	ADCLNE	GDWCADWS	GPSCCGEM	WCSCPG	FGKCRCKK--
$\delta$ -палутоксин-4	A-CATKN	QRCASW	AGPYCC	DGFYC	SCRSPYGC

В настоящий момент  $\delta$ -палутоксины из *P. luctuosus* являются, пожалуй, наиболее исследованными токсинами описываемого семейства. В отличие от гомологичных им  $\mu$ -ага-1 и 4, а также  $\beta/\delta$ -агатоксинов,  $\delta$ -палутоксины-1 и 2 не влияют на активацию каналов, однако вызывают эффект, схожий с  $\alpha$ -токсинами скорпионов, т.е. ингибирование инактивации  $\text{Na}^+$  каналов. Основное отличие от  $\alpha$ -токсинов скорпионов заключается в том, что  $\delta$ -палутоксин-2 конкурирует с  $\beta$ -токсинами скорпионов за связывание с рецепторным сайтом 4.

Чтобы установить взаимосвязь между эффектами  $\beta/\delta$ -агатоксина-1 и его структурой, необходимо определить функционально значимые а.о. Для этого необходимо получить  $\beta/\delta$ -ага-1 с модифицированными или замещенными, например, на Ala, остатками.



**Рисунок 10. Модель пространственной структуры  $\beta/\delta$ -агатоксина-1.** Модель построена на основе структуры близкого гомолога  $\delta$ -палутоксина-2 (код PDB 1V91). Боковые радикалы предполагаемых функционально важных остатков показаны линиями. Обозначены N- и C-концы основной цепи. Воображаемая поверхность молекулы раскрашена: остатки, по-видимому, ответственные за  $\beta$ -эффект, выделены фиолетовым, другие функционально важные остатки – синим, прочие – серым.

В нашей работе мы использовали природные «мутанты»  $\beta/\delta$ -ага-1, а именно молекулы с родственной первичной структурой и обладающие сходным действием. Вначале проанализируем аминокислотные остатки группы  $\beta/\delta$ -агатов (табл. 3), в соответствии с силой вызываемых ими эффектов (рис. 7). Большая разница наблюдается между  $\beta/\delta$ -ага-3 и  $\beta/\delta$ -ага-4. Они отличаются единственным остатком в положении 15: Pro у  $\beta/\delta$ -ага-3 и Leu у  $\beta/\delta$ -ага-4. Остаток пролина, по-видимому, вносит существенный вклад в формирование структуры молекулы (образует *cis*-пептидную связь в  $\delta$ -палутоксилах-1 и 2). Вероятно, поэтому при замене Pro15Leu происходит сильное снижение активности  $\beta/\delta$ -ага-4. В  $\beta/\delta$ -ага-7, у которого активность тоже слабая, имеется замена Lys31Gly, затрагивающая фармакофор  $\delta$ -палутоксина-2 (см. ниже). У  $\beta/\delta$ -ага-5 и -6 хорошо выражен один из эффектов (рис. 7), что можно объяснить укороченной петлей между вторым и третьим остатками цистеина по сравнению с другими  $\beta/\delta$ -агатами.

Для  $\delta$ -палутоксина-2 были определены функционально важные остатки, которые формируют «фармакофор» этой молекулы: Arg-8, Trp-12, Tyr-22, Ser-24, Arg-26, Met-28, Tyr-30, Arg-32 и Arg-34. Интересно, что этот фармакофор сохраняется практически во всех представителях семейства. Например, Trp-12, Tyr-22 и Ser/Thr-24 сохраняются во всех полипептидах, за исключением замен Trp12Ala и Ser24Asn в куртатоксине-1 и Tyr22Trp в  $\delta$ -палутоксине-3. Однако встречаются и некоторые вариации: в положениях 32 и 34 присутствуют положительно заряженные или большие гидрофобные остатки, в позиции 28 метионин заменяется другими гидрофобными остатками, а в позициях 8 и 30 могут располагаться разнообразные остатки.

Как было показано выше,  $\beta/\delta$ -агаты обладают сразу двумя эффектами: воздействуют на активацию и инактивацию  $\text{Na}^+$  каналов. При этом близкородственные  $\delta$ -палутоксины обладают эффектом только на инактивацию каналов. По сути,  $\beta/\delta$ - и  $\mu$ -агаты (наиболее изученные  $\mu$ -ага-1 и  $\mu$ -ага-4) в сравнении с  $\delta$ -палутоксинами можно считать имеющими «дополнительную» активность в отношении активации каналов. По этой причине остатки, которые отвечают за эту «дополнительную» функцию, могут быть локализованы. В  $\beta/\delta$ -ага-1 такими остатками, по-видимому, являются Ser-7, Tyr-28, Phe-29 и Ile-33. Соответствующие им остатки  $\delta$ -палутоксина-2: Gly-6, Ser-27, Met-28 и Arg-32. Все другие замены у  $\delta$ -палутоксина-2 по сравнению с  $\beta/\delta$ -ага-1 могут быть найдены и у остальных представителей этого семейства, обладающих активностью в отношении активации каналов, и таким образом являются нейтральными. Интересно, что все представленные остатки, ответственные за эффект токсина на активацию каналов, по-видимому, сближены в пространстве (рис. 10), а два из четырех входят в фармакофор  $\delta$ -палутоксина-2.

## Заключение

Структурное разнообразие и важная роль  $\text{Na}^+$  каналов во многих биологических процессах обуславливает интерес к этим объектам со стороны исследователей. Неудивительно, что в настоящее время описано большое количество лигандов  $\text{Na}^+$  каналов различной природы. Представленная работа дополняет существующее многообразие, демонстрируя, как с помощью арсенала современных методов в яде пауков можно найти и охарактеризовать вещества, проявляющие активность в отношении  $\text{Na}^+$  каналов млекопитающих и насекомых. Обнаруженные полипептиды являются как поровыми блокаторами, так и модуляторами различных стадий работы каналов – активации и инактивации. Кроме того, некоторые из найденных токсинов проявляют высокую специфичность в отношении насекомых и могут быть использованы как основа для разработки эффективных и безопасных инсектицидов.

## ВЫВОДЫ:

1. Проведено тестирование коллекции ядов 16 видов пауков из 9 семейств с целью поиска модуляторов функциональной активности потенциал-зависимых  $\text{Na}^+$  каналов насекомых и млекопитающих. Показано, что яд *Heriades melloteei* обладает наибольшим ингибирующим действием на каналы млекопитающих, а яд *Agelena orientalis* высокотоксичен для насекомых.
2. Из яда паука *Heriades melloteei* получены три полипептида (Нм-1–3), относящиеся к новым группам блокаторов  $\text{Na}^+$  каналов млекопитающих и насекомых. Эти полипептиды длиной 35–40 остатков содержат по 6 остатков цистеина, образующих 3 внутримолекулярные дисульфидные связи. Согласно полученным данным, Нм-1 и 2 являются поровыми блокаторами, а Нм-3 – ингибитором активации каналов.
3. Из яда паука *Agelena orientalis* получены семь полипептидов ( $\beta/\delta$ -агатоксины-1–7), специфично воздействующих на  $\text{Na}^+$  каналы насекомых. Все они содержат 36–38 остатков, среди которых 8 являются остатками цистеина, образующих 4 внутримолекулярные дисульфидные связи. Уникальность  $\beta/\delta$ -агатоксинов заключается в их способности к одновременному и потенциал-зависимому действию на процессы активации и инактивации каналов.
4. На основании моделей пространственной организации выделенных полипептидов и их сравнения с другими известными токсинами сделано предположение о локализации функционально важных аминокислотных остатков. У  $\beta/\delta$ -агатоксинов и родственных полипептидов выявлены аминокислотные остатки, вероятно отвечающие за проявление эффектов на активацию и инактивацию  $\text{Na}^+$  каналов.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи:

1. Billen, A. Vassilevski, A. Nikolsky, J. Tytgat, E. Grishin. Two novel sodium channel inhibitors from *Heriaeus melloteei* spider venom differentially interacting with mammalian channel's isoforms. *Toxicon*. **2008**, (52), 309–317
2. А. Никольский, Б. Биллен, А. Василевский, С. Филькин, Я. Титгат, Е. Гришин. Потенциал-зависимые натриевые каналы – мишени действия токсинов из яда паука *Heriaeus melloteei*. Биологические мембраны. **2009**, 26(4), 1–9
3. Billen B., Vassilevski A., Nikolsky A., Debaveye S., Tytgat J., Grishin E. Unique bell-shaped voltage-dependent modulation of Na<sup>+</sup> channel gating by novel insect-selective toxins from the spider *Agelena orientalis*. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285(24), 18545–18554.

### Тезисы докладов:

1. Никольский А., Василевский А., Гришин Е. Новые блокаторы Na<sup>+</sup> каналов из яда паука *Heriaeus melloteei*. Тезисы докладов XIV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2007», секция «Биология», Москва, 11-14 апреля **2007**, стр. 33
2. Никольский А., Василевский А., Гришин Е. Новые блокаторы Na<sup>+</sup> каналов из яда паука *Heriaeus melloteei*. Тезисы докладов и стендовых сообщений XX зимней международной молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» Москва, 11-15 февраля **2008**, стр. 73
3. Billen B., Vassilevski A., Nikolsky A., Tytgat J., Grishin E. Two novel peptides from *Heriaeus melloteei* spider venom differentially interacting with sodium channel isoforms. In Abstract book of The European Section Meeting of the International Society on Toxinology. Leuven, Belgium, 7-10 September **2008**, p. 36
4. Никольский А., Биллен Б., Василевский А., Титгат Я., Гришин Е. Полипептидные токсины паука *Heriaeus melloteei* – новые лиганды Na<sup>+</sup> каналов. Сборник тезисов 12-ой международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пущино, 10-14 ноября **2008**, стр. 97
5. Кузьменков А., Никольский А., Василевский А. Идентификация и изучение нового блокатора натриевых каналов из яда паука *Heriaeus melloteei*. XVI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2009», Москва, 13-18 апреля **2009**, стр. 52–53
6. Никольский А., Биллен Б., Василевский А., Гришин Е. Новый токсин из яда паука *Heriaeus melloteei*, модулирующий процесс активации потенциал-зависимых натриевых каналов.

Тезисы докладов IV Российского симпозиума «Белки и пептиды», Казань, 23-27 июня **2009**, стр. 296

7. Кузьменков А., Биллен Б., Никольский А., Василевский А., Титгат Я., Гришин Е. Новый пептидный блокатор натриевых каналов из яда паука *Heriades melloteei*. Тезисы докладов и стендовых сообщений XXII зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 8-11 февраля **2010**, стр. 38

8. Никольский А., Василевский А., Биллен Б., Титгат Я., Гришин Е.  $\beta/\delta$ -агатоксины из яда паука *Agelena orientalis* – уникальные модуляторы потенциал-зависимых натриевых каналов. Тезисы докладов и стендовых сообщений XXII зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 8-11 февраля **2010**, стр. 42

9. Никольский А., Биллен Б., Василевский А., Титгат Я., Гришин Е.  $\beta/\delta$ -агатоксины - новое семейство модуляторов потенциал-зависимых натриевых каналов. Сборник тезисов 14-ой Пушкинской международной школы-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века». Пущино, 19-23 апреля **2010**, стр. 49

10. Bert Billen, Alexander Vassilevski, Anton Nikolsky, Sarah Debaveye, Eugene Grishin, Jan Tytgat. Spider toxins with a dual function: modulation of both activation and inactivation of insect sodium channels. Abstract book of 10<sup>th</sup> Meeting of the Pan American Section of the International Society on Toxinology. San Jose, Costa Rica, April 18<sup>th</sup>-22<sup>nd</sup>, **2010**, p.57

11. A. Nikolsky, B. Billen, A. Vassilevski, J. Tytgat, E. Grishin.  $\beta/\delta$ -Agatoxins are unique modulators of voltage-gated sodium channels. Abstracts of the 35<sup>th</sup> FEBS Congress. Gothenburg, Sweden, 26 June-1 July, **2010**, p. 292–293

12. A. Nikolsky, B. Billen, A. Vassilevski, S. Debaveye, J. Tytgat and E. Grishin. Bimodal toxins from agelenid spider. Abstract book of The Biochemical Society Annual Symposium “Recent advances in membrane biochemistry”. Robinson College, Cambridge, UK, 5-7 January **2011**, p.25

13. Никольский А.С., Василевский А.А., Гришин Е.В. Новые модуляторы натриевых каналов. Тезисы докладов V Российского симпозиума «Белки и пептиды», Петрозаводск, 8-12 августа **2011**, стр. 226.