

Обзорная статья
УДК 577.112
DOI: 10.31857/S0869769824030064
EDN: ISGGZE

Лаборатория химии пептидов Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН им. Г.Б. Елякова: сорок лет исследований пептидов и белков морских анемонов

М.М. Монастырняя✉, Э.П. Козловская

Маргарита Михайловна Монастырняя
доктор химических наук, ведущий научный сотрудник
Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН им. Г.Б. Елякова,
Владивосток, Россия
rita1950@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3157-0930>

Эмма Павловна Козловская
доктор химических наук, главный научный сотрудник, профессор
Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН им. Г.Б. Елякова,
Владивосток, Россия
kozempa@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8110-0382>

Аннотация. В обзоре кратко описаны исследования, проводившиеся в течение последних 40 лет в лаборатории химии пептидов Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН (ЛХП ТИБОХ ДВО РАН) в сотрудничестве с российскими и зарубежными коллегами. Обсуждаются результаты поиска, идентификации и изучения структуры, биологической активности и механизмов взаимодействия с биологическими мишенями пептидов и полипептидов, продуцируемых тропической морской анемоной *Heteractis crisper* (= *Heteractis magnifica*, ранее *Radianthus macrodactylus*). Одним из основных достижений лаборатории за прошедшие годы является открытие нового структурного типа 2 нейротоксинов, а именно шести токсинов, которые в первое десятилетие зарубежных исследований (70–80-е годы прошлого столетия) не были идентифицированы среди представителей так называемых длинных анемомотоксинов, и среди них – первого, ранее неизвестного, двухцепочечного нейротоксина. Кроме того, установлено наличие нескольких мультигенных семейств, экспрессирующих α-пороформирующие токсины (актинопорины), ингибиторы сериновых протеаз (пептиды Кунитц-типа) и АРЕТх-подобные пептиды, образующих комбинаторные библиотеки, насчитывающие по несколько десятков высокомолекулярных представителей семейства. Методами *in silico* (гомологичное моделирование, аланиновый мутагенез, полноатомная молекулярно-динамическая (МД) симуляция) впервые предсказаны пространственные структуры исследуемых пептидов и комплексов с биологическими мишенями, проведен анализ их структурно-функциональных взаимоотношений. Это явилось основой для дальнейшего получения на базе комбинаторных библиотек рекомбинантных

и мутантных аналогов с целью проведения электрофизиологических исследований механизмов их молекулярного взаимодействия с мишенями, а также определения фармакологического потенциала. В обзоре кратко представлены наиболее важные результаты последних лет, связанные с открытием у ряда исследуемых пептидов анальгетической, противовоспалительной и противоопухолевой активности.

Ключевые слова: морские анемоны, нейротоксины, пептиды Кунитц-типа, APETx-подобные пептиды, дефензины, биологические мишени

Для цитирования: Монастырная М.М., Козловская Э.П. Лаборатория химии пептидов Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН им. Г.Б. Елякова: сорок лет исследований пептидов и белков морских анемонов // Вестн. ДВО РАН. 2024. № 3. С. 101–120.
<http://dx.doi.org/10.31857/S0869769824030064>

Review article

Laboratory of Peptide Chemistry, G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences: forty years of research on peptides and proteins of sea anemones

M.M. Monastyrnaya, E.P. Kozlovskaya

Margarita M. Monastyrnaya

Doctor of Chemical Sciences, Leading Researcher

G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok, Russia

rita1950@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0003-3157-0930>

Emma P. Kozlovskaya

Doctor of Chemical Sciences, Chief Researcher, Professor

G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok, Russia

kozempa@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-8110-0382>

Abstract. The review briefly describes a research carried out over the past 40 years at the Laboratory of Peptide Chemistry of G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS (LPCh of PIBOC FEB RAS), in collaboration with Russian and foreign colleagues. The results of search, identification, and study of the structure, the biological activity, and the mechanisms of an interaction with the biological targets of peptides and polypeptides produced by the tropical sea anemone *Heteractis crispa* (= *Heteractis magnifica*, formerly *Radianthus macrodactylus*) are discussed. One of the main achievements of LPCh over the past years is the discovery of new structural type 2 neurotoxins, namely, six toxins that were not identified among the representatives of so-called long anemonotoxins in the first decade of foreign research (70–80s of the last century), and among them the first, previously unknown, double-chain neurotoxin. In addition, the presence of several multigene families expressing α -pore-forming toxins (actinoporins), serine protease inhibitors (Kunitz-type peptides), and APETx-like peptides forming the combinatorial libraries of the several dozen of highly homologous family members has been established. Using *in silico* methods (homologous modeling, alanine mutagenesis, full-atom molecular dynamics (MD) simulation), the spatial structures of the studied peptides and complexes with biological

targets were predicted for the first time, and their structure-functional relationships were analyzed. This was the foundation for the further production of recombinant and mutant analogues on the basis of the combinatorial libraries for the purpose of conducting the electrophysiological studies of the mechanisms of their molecular interaction with targets as well as determining the pharmacological potential. In the review the most important results of recent years are presented. They are related to the discovery of analgesic, anti-inflammatory, and antitumor activity in a number of the studied peptides.

Keywords: sea anemones, neurotoxins, Kunitz-type peptides, APETx-like peptides, defensins, biological targets

For citation: Monastyrnaya M.M., Kozlovskaya E.P. Laboratory of Peptide Chemistry, G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences: forty years of research on peptides and proteins of sea anemones. *Vestnik of the FEB RAS*. 2024;(3):101–120. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.31857/S0869769824030064>

Введение

Наземные и морские ядовитые организмы, как известно, являются одним из наиболее богатых источников разнообразных биологически активных соединений как белковой, так и небелковой природы, многие из которых обладают фармакологическим потенциалом. Поэтому в последние несколько десятилетий продуцируемые этими организмами соединения, в частности белковой природы, широко изучаются как перспективные терапевтические агенты [1, 2]. В ходе длительного эволюционного развития белковые структуры претерпели значительную диверсификацию, и многие из них, благодаря токсическому воздействию на организм-мишень (жертву или потенциального хищника), превратились в мощное средство защиты и нападения продуцирующего организма.

К наиболее известным морским ядовитым организмам принадлежит тип Cnidaria, который объединяет морские анемоны, медузы, кораллы [3]. Данные кишечнополостные, обитающие практически во всех водах Мирового океана, относятся к свободноплавающим (медузы) или ведущим прикрепленный к грунту образ жизни (морские анемоны, гидроидные полипы, кораллы). Как правило, они питаются планктоном, зоохлореллами, охотятся на маленьких моллюсков и рыбок. Характерной особенностью морских анемонов является наличие щупалец, снабженных уникальным аппаратом нападения в виде специализированных стрекательных жалящих клеток, книдоцитов (или нематоцитов), которые служат морским анемонам в качестве орудия защиты от врагов и для добычи пищи. Книдоциты содержат специфические внутриклеточные органеллы (книдоцисты, или нематоцисты), снабженные ядовитым секретом, который и обеспечивает поражение врага или пищевого объекта. Именно необходимость в питании и защите от потенциальных хищников предопределила способность морских анемонов производить сильнодействующие белковые токсины.

Надо сказать, что ядовитый секрет анемонов является серьезным ограничением для дайверов, аквалангистов и туристов, поскольку внешний вид морских анемонов, напоминающих прекрасные цветы, привлекает к контакту с ними подводных пловцов, в то время как прикосновение к этим животным чревато сильными ожогами и может вызвать сильнейшую аллергию или даже летальный исход. Изучение компонентов ядовитого секрета морских анемонов на молекулярном уровне, главным образом токсинов (анемонотоксинов), началось только в 70-х годах прошлого века. Из нескольких тропических видов были выделены индивидуальные токсины, установлены их аминокислотные последовательности, и началось широкомасштабное исследование биологической активности и структурно-функциональных взаимосвязей, продолжающееся и по сей день. Этому способствует небывалый интерес к анемонотоксинам [1–3], а также другим белкам и пептидам морских анемонов, которые, благодаря специфичности связывания с биологическими мишенями (ионными каналами и рецепторами, цитоплазматическими мембранами, протеолитическими ферментами и др.), являются незаменимыми биохимическими и молекулярными инструментами изучения функциональной активности и механизмов функционирования мишеней.

В этой юбилейной работе кратко изложены основные результаты сорокалетних-структурно-функциональных исследований нативных пептидов и полипептидов – представителей

нескольких структурных классов белковых соединений, продуцируемых морской анемоной *H. crispera* (нейротоксинов, актинопоринов, пептидов Кунитц-типа, АРЕТх-подобных пептидов и дефензинов), а также их рекомбинантных аналогов, которые проведены методами белковой химии, биохимии, молекулярной и клеточной биологии, электрофизиологического тестирования и *in vivo* исследований, с привлечением протеомных подходов, а также методов молекулярного моделирования для установления пространственной организации и механизмов взаимодействия с мишенями. Для ряда пептидов обсуждается специфичность и фармакологический потенциал.

1. Исследование структуры и функциональной активности *Radianthus* (*Heteractis*) нейротоксинов

1.1. Аминокислотные последовательности

В 1984 г. автоматическим секвенированием по методу Эдмана впервые была установлена аминокислотная последовательность высокотоксичного нейротоксина RTX-III [4], а затем в течение нескольких лет последовательности еще четырех высокомолекулярных нейротоксинов, RTX-I [5], RTX-II [6], RTX-IV и RTX-V [7] (рис. 1, а), различающихся величинами токсичности для млекопитающих и членистоногих. Данные последовательности, в отличие от последовательностей известных нейротоксинов морских анемонов АТХ-II (*Anemonia sulcata*), АpА, АpВ (*Anthopleura xanthogrammica*) и др. [8], содержащих 1–2 заряженных остатка на С-конце молекул, имели по четыре таких остатка (рис. 1, б). Положение дисульфидных связей *Radianthus* нейротоксинов RTX-I–RTX-V соответствовало таковому всех вышеупомянутых нейротоксинов [8].

Драматическим моментом для *Radianthus* токсинов RTX-I–RTX-V оказалось непризнание первичной структуры RTX-III французским исследователем Мишелем Лаздунским, корифеем в области структурной химии анемонотоксинов, первоначально не поверившим в структуру RTX-III, установленную в России. Однако позже научному сообществу пришлось признать достоверность полученных в ЛХП результатов и согласиться с существованием нового структурного типа 2 анемонотоксинов (NaTx), поскольку в последующие годы он пополнился представителями из других видов анемонов [9–11] (рис. 1, а) и в настоящее время насчитывает 14 нейротоксинов [8], которые отличаются несколькими точно лока-



Рис. 1. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей нейротоксинов: структурного типа 2 – RTX-I (P30831) [5], RTX-II (P30783) [6], RTX-III (P30832) [4], RTX-IV (P30784) и RTX-V (P30785) [7] из *H. crispera*, Rp-II (P01534) из *R. paumotensis* [9], SHTX-IV (B1B519) [10] из *Stichodactyla haddoni*, Sh1 (319651) [8, 11] из *Stichodactyla helianthus* (а); структурного типа 1 – АТХ-II (P01528) [12] из *Anemonia sulcata*, АpА (P01530) [13], АpВ (P01531) [14] из *Anthopleura xanthogrammica* (б). На сером фоне показаны идентичные аминокислотные остатки, на белом – точечные замены остатков в последовательностях, красным цветом – функционально значимый для связывания с Na_v остаток Arg13 [8]. Прямые линии в верхней части рисунка показывают соединение C1–C5, C2–C4, C3–C6 в дисульфидных мостиках между остатками цистеина (показаны жирным шрифтом). Элаймент выполнен с помощью программы Vector NTI

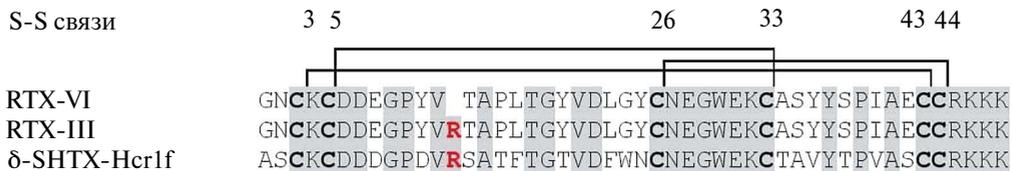


Рис. 2. Множественное выравнивание высокогомологических аминокислотных последовательностей *Heteractis* нейротоксинов RTX-VI, RTX-III и δ-SHTX-Hcr1f (=Rp-II). На сером фоне показаны идентичные остатки в последовательностях, на белом фоне – точечные замены остатков, красным цветом – функционально значимый для связывания с Na_v остаток Arg13 [8]. Прямые линии в верхней части рисунка показывают соединение дисульфидных связей C1-C5 (а.о. 3-43), C2-C4 (а.о. 5-33), C3-C6 (а.о. 26-44) между остатками цистеина (показаны жирным шрифтом). Элаймент выполнен с помощью программы Vector NTI

лизованными по всей длине последовательности остатками от нейротоксинов структурного типа 1 (рис. 1, б) [12–14].

В настоящее время помимо структурных типов 1 и 2 нейротоксинов известно еще как минимум два типа, один из которых, тип 3 с несколькими представителями, относится к «коротким» (около 30 а.о.), а другой, тип 4, включает всего два высокогомологических представителя (49 а.о.) [8, 15]. К сегодняшнему дню токсины морских анемонов, в силу высокой токсичности, специфического действия на различные типы потенциал-зависимых натриевых каналов (Na_v s), продолжают оставаться излюбленными объектами для токсикологов, молекулярных биологов, фармакологов и специалистов, занимающихся вопросами теоретической медицины (биомедицины).

Продолжающийся поиск и исследование пептидов морской анемоны *H. crispa* преподнесли еще сюрприз: открытие одного необычного нейротоксина, названного нами RTX-VI, и второго – δ-SHTX-Hcr1f (идентичного Rp-II, согласно подобию аминокислотной последовательности с таковой нейротоксина Rp-II из *R. paumotensis* [9]). Оказалось, что у RTX-VI отсутствует функционально значимый для нейротоксинов типа 2 и типа 1 остаток Lys13/14 [15] (потерянный, очевидно, в ходе посттрансляционной модификации), а его аминокислотная последовательность аналогична таковой RTX-III [4] (за исключением отсутствующего остатка Lys13). Молекула RTX-VI состоит, таким образом, из двух цепочек, соединенных дисульфидными мостиками C1-C5 и C2-C4 (рис. 2). Согласно расчетным данным, нейротоксин RTX-VI сохранил фолд, характерный для анемонотоксинов обоих типов. Однако потеря Lys13 привела к утрате токсичности [15].

Интересно, что, несмотря на продолжающийся поиск новых представителей нейротоксинов среди новых видов морских анемонов, до сих пор очень редко удается найти структуру, принадлежащую какому-либо новому $NaTx$ [8].

1.2. Вторичная и пространственная структура *Heteractis* нейротоксинов

Высокое подобие аминокислотных последовательностей, идентичная локализация дисульфидных S-S связей и наличие консервативных остатков у нейротоксинов типа 1 и типа 2 (рис. 1, а, б; 2) позволили сделать заключение об их общем анцестральном гене [8]. Хотя до сих пор отсутствуют данные о 3D-структурах, установленных экспериментально, высокая гомология аминокислотных последовательностей нейротоксинов морских анемонов обеспечивает наличие у всех представителей характерного дефензин-подобного фолда с близкой вторичной структурой (рис. 3) [15]. Согласно *in silico* расчетным данным вторичная структура нейротоксинов состоит из четырех β-тяжей и трех петель, одна из которых, так называемая Arg14 loop (для нейротоксинов типа 1), как было показано позже, обеспечивает аффинность их связывания с сайтом 3 Na_v s и селективность по отношению к различным подтипам каналов [8].

Показано, что дипольные моменты молекул нейротоксинов типа 1 и типа 2 различаются как по величине, так и по направлению (рис. 3). Вероятно, этим объясняются различия

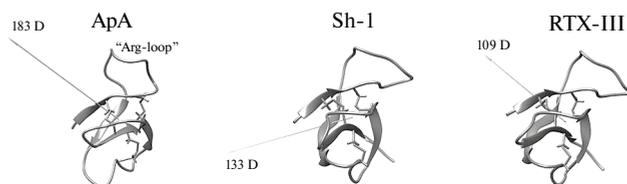


Рис. 3. Ленточные диаграммы моделей 3D-структур нейротоксинов типа 1 и типа 2: ApA (тип 1), Sh-1 и RTX-III (тип 2), имеющих β -дефензин-подобный фолд (созданы на основе гомологичного моделирования 3D-структуры нейротоксина Sh-1). Стрелками показаны дипольные моменты; их величины обозначены в Дебаях (D): 183, 133, 109 [8, 15]

в активности нейротоксинов и их возможности взаимодействовать с разными подтипами Na_v s каналов. Различия между молекулярными поверхностями нейротоксинов обусловлены наличием отличающихся функционально значимых аминокислотных остатков, которые обеспечивают сохранение активности нейротоксинов по отношению к разным подтипам каналов.

1.3. Изучение молекулярных механизмов взаимодействия с Na_v s методами электрофизиологического тестирования и молекулярного моделирования

В настоящее время внимание исследователей акцентировано на всестороннем и детальном изучении молекулярных механизмов взаимодействия нейротоксинов с различными подтипами Na_v s, участвующими в физиологических и патологических процессах, главным образом на их электрофизиологическом тестировании и определении специфичности модулирующего действия по отношению к различным подтипам. Так, совместно с бельгийскими и московскими коллегами было показано, что *Heteractis* нейротоксины RTX-III, RTX-VI и Rp-II, в отличие от нейротоксинов типа 1, например ATX-II, связываются с разными подтипами Na_v s [15] (см. таблицу).

Записи токов через клеточную мембрану ооцита *X. laevis*, вызванные изменением мембранного потенциала в контрольных условиях и в присутствии 10 мкМ токсина (рис. 4), продемонстрировали эффективность взаимодействия RTX-III с подтипом Na_v 1.3, а RTX-VI – с подтипом Na_v 1.2. При этом оба нейротоксина связываются также с Na_v 1.6 и подтипами

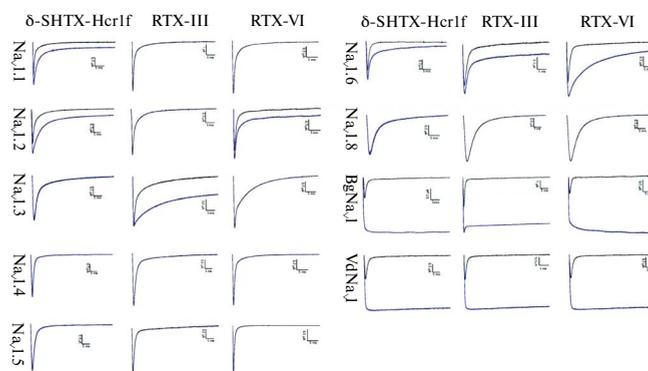


Рис. 4. Влияние δ -SHTX-Hcr1f (=Rp-II), RTX-III и RTX-VI на токи Na_v s млекопитающих и паукообразных. Показаны записи токов через клеточную мембрану ооцита *X. laevis*, вызванных изменением мембранного потенциала, в контрольных условиях и в присутствии 10 мкМ токсина [15] (шкалы изменения амплитуд токов через каналы соответствуют 0,5–1 мкА за 5 мс)

Действие нейротоксинов Rp-II (=δ-SHTX-Hcr1f), RTX-III, RTX-VI и АТХ-II (10 мкМ) на токи каналов млекопитающих (Na_v1.1–Na_v1.8), насекомых (BgNa_v1) и арахнид (VdNa_v1), экспрессированные в яйцеклетках *Xenopus laevis* [15]

NaTx	Na _v 1.1	Na _v 1.2	Na _v 1.3	Na _v 1.4	Na _v 1.5	Na _v 1.6	Na _v 1.7	Na _v 1.8	BgNa _v 1	VdNa _v 1
Rp-II	+	+	–	–	–	+	н.о.	–	+	+
RTX-III	–	–	+	–	–	+	н.о.	–	+	+
RTX-VI	–	+	–	–	–	+	н.о.	–	+	+
АТХ-II	+	+	+	+	+	+	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.

Примечание. н.о. – активность нейротоксинов в отношении данных подтипов NaV не определяли

членистоногих BgNa_v1 и арахнид VdNa_v1 (см. таблицу), что свидетельствует о перспективности их использования в качестве инсектотоксинов.

Для понимания движущих сил взаимодействия нейротоксина δ-SHTX-Hcr1f с каналом rNa_v1.2 впервые было проведено полноатомное молекулярно-динамическое моделирование (МД симуляция) комплекса δ-SHTX-Hcr1f-rNa_v1.2, внедренного в липидный бислой (рис. 5), результаты которого свидетельствуют о существенных конформационных изменениях структуры канала при взаимодействии с токсином. Согласно расчетным данным заряженные С-концевые остатки (Lys48, Lys46, Glu31) координируют ориентацию токсина во внеклеточной области порового домена канала посредством сети электростатических взаимодействий и водородных связей. В то же время остатки Lys32, Asn25, Arg13 и Cys33 взаимодействуют с остатками Glu1616 (на S3 спирали) и Ser1621 (на S4 спирали) VSD-IV домена канала. При этом Cys33 образует две водородные связи с Val1620 и Ser1621 у основания спирали S4 VSD-IV [15].

Ранее в ходе электрофизиологических исследований было установлено, что благодаря наличию у токсина RTX-III гидрофобной поверхности его связывание с наружной поверхностью порового домена сайта-3 канала rNa_v1.2 стабилизирует образующийся белок-белковый комплекс (за счет образования межмолекулярных гидрофобных контактов [15]). Установлено, что вследствие ингибирования процесса инактивации канала замедляется фаза реполяризации потенциала действия мышечных и нервных волокон [8, 16, 17]. Таким образом, благодаря положительному инотропному эффекту нейротоксины способны оказывать кардиостимулирующий эффект, что может быть использовано в медицинской практике в ряде экстремальных ситуаций. Существенным препятствием для применения нейротоксинов морских анемонов является их высокая токсичность для млекопитающих [8]. Тем не менее получение мутантных аналогов, подобных RTX-IV и RTX-V, низкоокисных для млекопитающих [8], а также нетоксичного рекомбинантного rRTX-VI позволит преодолеть это затруднение.

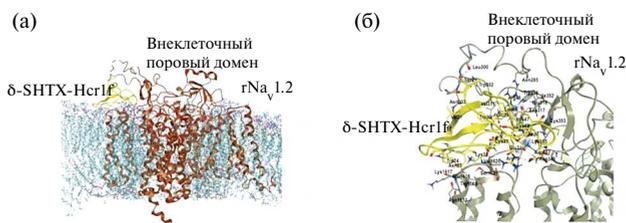


Рис. 5. Взаимодействие δ-SHTX-Hcr1f (=Rp-II) с rNa_v1.2: ленточная диаграмма комплекса δ-SHTX-Hcr1f-rNa_v1.2 в ДПФХ липидном бислое; молекулярные поверхности δ-SHTX-Hcr1f окрашены в желтый, rNa_v1.2 – в бордово-коричневый, ДПФХ – в голубой цвет (а); межмолекулярные взаимодействия в комплексе δ-SHTX-Hcr1f-rNa_v1.2 – желто-зеленоватый цвет, показаны участвующие в связывании боковых цепей нейротоксина и канала водородные связи (зеленый пунктир), ионные и π-катионные взаимодействия (синие и оранжевые контуры соответственно) (б) [15]

2. α -Пороформирующие токсины (актинопорины). Структура и механизм взаимодействия с цитоплазматическими и модельными мембранами

Первые представители α -пороформирующих токсинов морских анемонов (называвшихся первоначально гемолизинами и/или цитолизинами в силу способности формировать в цитоплазматических мембранах эукариотических клеток водонепроницаемые поры, завершающиеся лизисом мембран и гибелью клеток) были выделены из водных гомогенатов животных в начале 70-х годов прошлого столетия [18–20]. Различными хроматографическими методами из *R. macrodactylus* (*H. crispus*) выделено в высокоочищенном состоянии четыре *Radianthus* (*Heteractis*) актинопорина, RTX-A, RTX-S, RTX-SII, RTX-G [21], а из *Oulactis orientalis* – два актинопорина, Or-A и Or-G [22]. На основании установленных нуклеотидных последовательностей кодирующих генов выведены полные аминокислотные последовательности полипептидов RTX-SII [23, 24], RTX-A [25], Or-A и Or-G [26] (рис. 6). Позже было показано, что *Heteractis* актинопорины принадлежат к мультигенному семейству [27].

К настоящему времени молекулярный механизм цитолитического действия актинопорина достаточно хорошо исследован [28–35]. Он включает три стадии: 1) специфическое взаимодействие так называемого РОС-сайта связывания актинопорина с фосфохолиновой головкой мембранного сфингомиелина (СМ) и последующее «заякоривание» молекулы в мембране (рис. 7, стадия 1) [30]; 2) конформационная перестройка N-концевого фрагмента

RTX-SII	5A ¹ RLAGTITL GASLGFQILD KVLGELGKVS	RKIAVGVDNE SGGSWTALNA YFRSGTTDVI	60
RTX-A	ALAGAIIA GASLTFQILD KVLAE ¹ LGGVS	RKIAIGIDNE SGGSWTALNA YFRSGTTDVI	58
OR-G	GAIIA GAALGFNVHQ TVLKALGQVS	RKIAIGVDNE SGGTWTALNA YFRSGTTDVI	55
OR-A	ATFVYLA KVLAE ¹ LGGVS	RKIAVGVDNE SGGSWTALNA YFRSGTTDVI	47
	N-конец		
RTX-SII	LPEFVFNQKA LLYSGR ¹ KDTG PVATGAVAAF	AYHSDGHTL GVHFSVFPDY NLYSNW ¹ NDVK	120
RTX-A	LPEFVFNQKA LLYSGR ¹ KNRG PDTTGAVGAL	AYHSDGHTL GVHFSVFPDY NLYSNW ¹ NDVK	118
OR-G	LPEFVFNQKA LLYSGQKDTG PVATGAVGVL	AYHSDGHTL GVHFSVFPDY NLYSNW ¹ NDVK	115
OR-A	LFDLVFNQKA LLYSGGKDTG PVATGVVGL	AYHSDGHTL AILF ¹ SVFDY NLYSNW ¹ NDVK	107
	POC-сайт (Lys112, Trp116, 117)		
RTX-SII	IYSGKRRADQ AHYEDMYG- NPVEGDNGWH	QKNLGYGLKN KGHTS ¹ AVEA ILEIRIS ¹ --	177
RTX-A	VYSGKRRADQ AHYEDLYYS- NPVEGDNGWH	QKNLGYGLKN KGHTS ¹ AGEA ILEIRIS ¹ --	175
OR-G	VYGRRRADQ AHYEGLLYG- IPYGGDNGWH	ARKLGYGLKG RGF ¹ KSSAQS ILEIHVTKA-	173
OR-A	VYSGKRRADQ GHS ¹ EDLSYG- NPVEGDNGWH	ARKLGYGLKE RGF ¹ KSSAQS ILEIHATKA-	165
	RGD/GGD-трипептид		

Рис. 6. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей *Radianthus* и *Oulactis* актинопорина. Выделены N-концевой фрагмент и РОС-сайт связывания с мембраной, подчеркнут RGD/GGD-трипептид

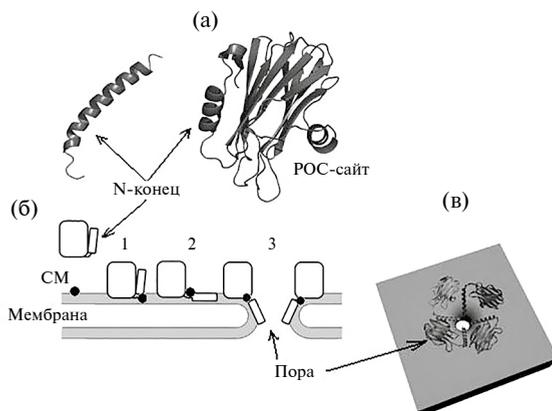


Рис. 7. Трехступенчатый механизм порообразования (стадии 1–3). Ленточная диаграмма пространственной структуры актинопорина с функционально значимыми фрагментами (N-конец, РОС-сайт) (а), связывание с мембранным сфингомиелином (СМ) и заякоривание в мембране N-конца (б), схематичное изображение тороидальной поры (в) [33]

молекулы (1–28 а.о.), который диссоциирует с поверхности белковой глобулы и погружается в липидный матрикс, при этом спирализованный участок N-конца (15–25 а.о.) удлиняется (рис. 7, стадия 2), и затем весь фрагмент включается в мембрану [31]; 3) ассоциация нескольких N-концевых фрагментов (четырёх [18, 19, 28, 29] или восьми-девяти [32]), приводящая к образованию функциональной поры [33] (рис. 7, стадия 3).

Изучение механизма взаимодействия *Radianthus (Heteractis)* актинопоринов с биологическими мембранами проводили на эритроцитах кролика [28, 29], яйцеклетках морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*, в мембранах которых отсутствует СМ [34], и на культурах некоторых опухолевых клеток [35, 36]. В качестве модельных систем использовали липосомы [18, 19, 28] и бислоиные липидные мембраны (БЛМ) [19, 20, 34] различного липидного состава. Установлено, что при отсутствии СМ в мембранах они остаются нечувствительными к действию актинопоринов [28, 29]. Показано, что образуемые актинопоринами поры/каналы являются катионселективными [29, 34, 37], при этом величина их гемолитической активности зависит от гидрофобности и направления гидрофобного момента молекулы [24, 33, 38], наличия и количества заряженных а.о. в N-концевом фрагменте, а также локализации а.о. Тгр и Тут ароматического РОС-сайта связывания, количества образуемых гидрофобных, водородных и π -катионных взаимодействий с фосфохолиновой головкой СМ [38].

Нами была высказана гипотеза, что помимо РОС-сайта связывания и амфифильного N-концевого фрагмента, участвующих в трехстадийном механизме взаимодействия с липидной мембраной (рис. 7) [33], актинопорины (например, RTX-Ala) имеют дополнительный (или альтернативный) сайт связывания – трипептид 141RGD143 (так называемый RGD-мотив, характерный для мембраноактивных пептидов и белков) [39]. Как известно, этот трипептид отвечает за адгезию клеток к внеклеточному матриксу и представляет собой минимальный интегринсвязывающий мотив RGD-распознающих интегринов. Справедливость данной гипотезы подтверждает сравнительный анализ калориметрических кривых плавления нативных теней и модифицированных актинопорином, который показал наличие у последних сдвигов А-, В-, С- и D-переходов, характерных для белков цитоскелета эритроцита (рис. 8, а, б), а также вымывание из мембраны актина (рис. 8, в), что указывает на разрыв связи между актином цитоскелета и мембранными рецепторами, интегринами [40].

Очевидно, что такое взаимодействие RGD-мотива с интегрином $\alpha V\beta 3$ объясняет способность актинопоринов ингибировать/блокировать процессы оплодотворения яйцеклеток спермой у морского ежа *S. intermedius* (поверхность головки сперматозоидов содержит трипептид RGD) (рис. 9, а, б) [39]. Согласно литературным данным, механизм оплодотворения яйцеклеток обусловлен связыванием трипептида RGD сперматозоидов с β -цепью мембранных интегринов яйцеклеток, $\alpha V\beta 3$ и/или $\alpha V\beta 5$ (рис. 9, а) [39], вызывающим разрыв

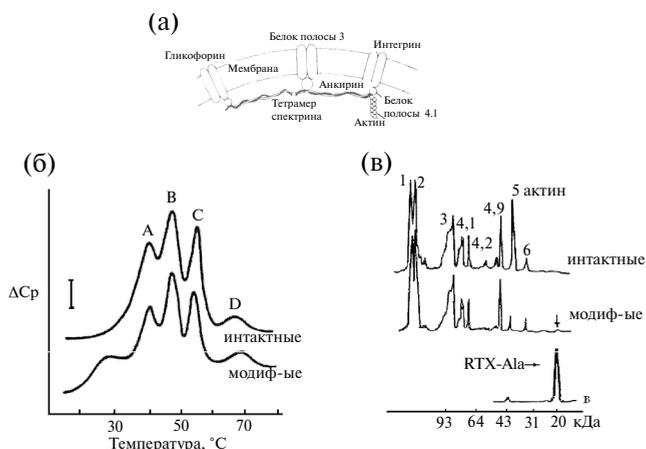


Рис. 8. Схема фрагмента эритроцитарной мембраны, мембранных белков и белков цитоскелета (а), калориметрические кривые (б), денситограммы SDS-электрофореза теней эритроцитов человека (интактные и модифицированные актинопорином RTX-A) (в) [40]

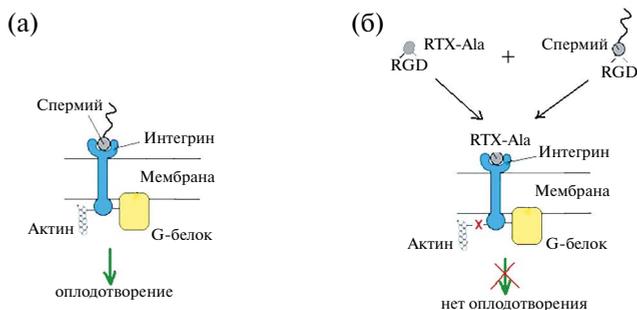


Рис. 9. Оплодотворение яйцеклетки морского ежа *S. intermedius* спермией (а), ингибирование оплодотворения яйцеклетки актинопорином RTX-Ala (б)

связи интегрин с мембранным актином. Обнаруженный ранее разрыв связи между эритроцитарными интегринами и актином (рис. 8, в), основным белком цитоскелета, происходит под действием RGD-мотива актинопорина, а вымывание актина из мембраны ооцита, аналогичное происходящему в эритроцитах (рис. 8, в), ингибирует процесс оплодотворения яйцеклеток сперматозоидами (рис. 9, б).

Установлено, что *Radianthus (Heteractis)* актинопорины, RTX-Ala, rHct-S3, обладают канцерпревентивным (противоопухолевым) действием, обусловленным нарушением путей сигнальной трансдукции [24, 35]. Они индуцируют р53-независимый апоптоз и ингибируют активность онкогенных AP-1 и NF-κB ядерных факторов в концентрации 0,0338 нМ, которая более чем в 16 раз, меньше токсической концентрации RTX-Ala (0,57 нМ), проявляемой по отношению к опухолевым клеткам HeLa, THP-1, MDA-MB-231 и SNU-C4 [35, 36]. Очевидно, противоопухолевую активность актинопоринов можно объяснить как цитолитическим действием невысоких концентраций этих полипептидов на цитоплазматические мембраны опухолевых клеток, так и взаимодействием их RGD-мотива с мембранными интегринами этих клеток, приводящим к блокированию их пролиферации [35]. Таким образом, очевидно, что характерный для всех представителей α-пороформирующих токсинов морских анемонов RGD-мотив способен проявлять себя дополнительным сайтом связывания этих токсинов с биологическими и модельными мембранами. Способность нетоксичных концентраций актинопоринов подавлять рост опухолевых клеток и предотвращать развитие некоторых видов рака позволяет рассматривать актинопорины в качестве возможной модели для конструирования на их основе препаратов, тормозящих и предотвращающих развитие злокачественных опухолей.

3. Нетоксичные пептиды морской анемоны *H. crisper* (= *H. magnifica*)

3.1. Пептиды Кунитц-типа: структура и активность

Первая структура ингибитора сериновых протеаз трипсина и химотрипсина (пептида Кунитц-типа) InIV была установлена в 1984 г. методом автоматической деградации по Эдману [41]. Тогда же впервые было обнаружено наличие еще не менее 12 представителей пептидов Кунитца в исследуемом образце *R. macrodactylus*. В дальнейшем их выделение и изучение было продолжено только через 20 с лишним лет методами белковой химии и молекулярной биологии. Так, впервые было установлено, что пептиды Кунитц-типа кодируются разными мультигенными семействами и образуют комбинаторную библиотеку, включающую, согласно структурно-функциональному и филогенетическому анализу (рис. 10, а, б), пептидные кластеры, состоящие из 33 HCGS-, 33 HCRG- и 6 HCTX-пептидов, близких по структуре, но отличающихся физико-химическими характеристиками и функциональной активностью [42, 43]. Установлено, что основные отличия аминокислотных последовательностей Кунитц-пептидов (в виде точечных замен остатков) находятся в реактивном сайте, а также в сайте слабых взаимодействий (рис. 10, а), а функционально значимые остатки,

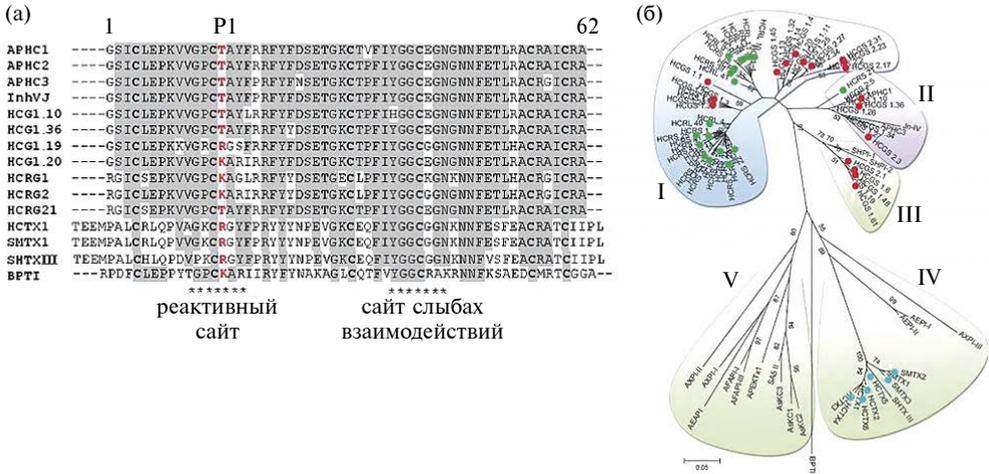


Рис. 10. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей пептидов Кунитца морской анемоны *H. crista*: APHC1, APHC2, APHC3, InhVJ, HCRG1, HCRG2, HCRG21, HCGS 1.10, HCGS 1.19, HCGS 1.20, HCGS 1.36, HCTX1, токсинов анемоны *Stichodactyla mertensii* SMTX1 и SMTX A49E, *Stichodactyla helianthus* SHTXIII, а также ингибитора трипсина BPT1 из *B. taurus*; идентичные а.о. показаны на темно-сером фоне, консервативные – на светло-сером (а). Филогенетическое дерево пептидов Кунитц-типа из морских анемон семейств Actiniidae и Stichodactylidae, построенное методом минимальной эволюции; представители комбинаторной библиотеки *H. crista* формируют на дереве четыре кластера: I–III представлены HCGS-/HCRG-пептидами, IV – HCTX-пептидами; HCGS-пептиды обозначены красными кружками, HCRG-пептиды – зелеными, HCTX/SMTX-пептиды – голубыми; последовательности пептидов с P1Lys показаны на синем фоне, с P1Thr – на розовом фоне, с P1Arg – на зеленом фоне [42] (б)

аргинин, лизин, треонин (14K/R/T), определяющие эволюционную функционализацию и кластеризацию пептидов, – в P1 положении последовательности (рис. 10, б) [42].

Появление положительно заряженного P1Lys и полярного P1Thr в реактивном сайте способствовало, соответственно, субфункционализации и неофункционализации пептидов Кунитц-типа, а действие ускоренной эволюции на их гены в рамках отдельного вида *H. crista*/*H. magnifica* привело к появлению комбинаторных библиотек [42, 43].

Исследование взаимодействия нативных и рекомбинантных пептидов Кунитц-типа *H. crista* с молекулярными мишенями продемонстрировало, что они ингибируют трипсин и химотрипсин [44–46], а некоторые из них (HCRG1 и HCRG2 с P1Lys) являются не только ингибиторами протеаз, но и модуляторами потенциал-зависимых калиевых каналов (K_v 1.1, K_v 1.2, K_v 1.3, K_v 1.6, Shaker IR) [47], т.е. представляют собой бифункциональные пептиды Кунитц-типа.

Впервые обнаружено, что нативные пептиды APHC1–APHC3 и рекомбинантный пептид гHCRG21, имеющие треонин в P1 положении аминокислотной последовательности, модулируют TRPV1-рецептор [48, 49], причем гHCRG21 является его полным антагонистом (рис. 11) [49]. В концентрации 100 мкМ он блокирует индуцированные капсаицином токи в канале на 95%. Полумаксимальное ингибирование рецептора наблюдается при концентрации гHCRG21 6,9 мкМ, благодаря чему пептид проявляет анальгетическую активность *in vivo* в модели тепловой стимуляции боли [49, 50] (в настоящее время гHCRG21 находится на стадии доклинических испытаний).

Установлено, что пептиды HCRG1 и HCRG2 подавляют синтез провоспалительных медиаторов (proIL-1 β , IL-6 и TNF α), индуцированный добавлением бактериального ЛПС [46]. Согласно результатам *in vivo* испытаний и *in vitro* тестирования на различных клеточных культурах, установлено, что рекомбинантные пептиды гHCGS1.10, гHCGS1.19, гHCGS1.20 и гHCGS1.36 обладают противовоспалительной активностью [51]. В концентрациях 1–10 мкМ пептиды гHCGS1.19, гHCGS1.20, гHCGS1.36, гHCTX1 и гSMTX1 A49E проявляют антигистаминную активность, обусловленную, по-видимому, либо блокированием H1-гистаминовых рецепторов, либо взаимодействием с G-белками [52]. Возможно также, что они оказывают ингибирующее действие на потенциал-зависимые кальциевые (Ca_v s)

	1	17	41
Hcr 1b-1	GTPCKCHGYIGVYWFMLAGCPNGYGYNLSCP YFLGICCVDR-		
Hcr 1b-2	GTPCKCHGYIGVYWFMLAGCPNGYGYNLSCP YFLGICCVKK-		
Hcr 1b-3	GTPCKCHGYIGVYWFMLAGCPDGYGYNLSCP YFLGICCVKK-		
Hcr 1b-4	GTPCDCYGYTG VYWFMLSRCP SGYGYNLSC HYFMGICCVKR-		
APETx1	GTTTCYCGKTTIGIYWFEGTKCP SNRGYTGSCGYFLGICCY PVD		
APETx2	GTACSCGNSKGIYWEYRPSCP TDRGYTGSCRYFLGTCTPAD		

Рис. 13. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей APETx-подобных пептидов из *H. crisper*: Hcr 1b-1 (P0DL87), Hcr 1b-2 (C0HL52), Hcr 1b-3 (C0HL53), Hcr 1b-4 (C0HL54) [56], APETx1 (P61541) и APETx2 (P61542) из *A. elegantissima* [57]. Идентичные остатки изображены на светло-сером фоне, точечные замены остатков – на белом фоне. Элаймент выполнен с помощью программы Vector NTI [56]

казались гомологичны таковым токсинов APETx1 и APETx2 морской анемоны *Anthopleura elegantissima* [57, 58]. Как известно, APETx2 является модулятором кислоточувствительных ионных каналов (ASICs – Acid-sensing ion channels) и оказывает на них ингибирующий эффект [58].

Известно, что ASICs участвуют в восприятии кислотоопосредованной, воспалительной и постоперационной боли, обусловленных патологическими процессами [57, 58]. Электрофизиологическое исследование пептидов Hcr 1b-1–Hcr 1b-4 на ASICs каналах показало наличие ингибирующего (для всех пептидов) и/или потенцирующего (для Hcr 1b-4) эффектов, поэтому их отнесли к группе APETx-подобных пептидов, которые, в отличие от токсинов APETx1 и APETx2, нетоксичны *in vivo* даже в высоких концентрациях [59].

Впервые для представителей Hcr 1b-2–Hcr 1b-4 морских анемонов обнаружено ингибирующее действие на токи подтипа ASIC1a [59] (который участвует в процессах передачи нервного возбуждения, гибели нейронов, эпилепсии, ишемических процессах [58]). Показано, что в насыщающих концентрациях (100–120 мкМ) Hcr 1b-2–Hcr 1b-4 ингибируют амплитуду тока через ASIC1a каналы на 64, 70 и 86%, а пептиды Hcr 1b-2 и Hcr 1b-3 (120 мкМ) ингибируют токи ASIC3 подтипа на ~81% и ~74% соответственно [59].

Интересной особенностью нетоксичных APETx-подобных пептидов *H. crisper*, отличающей их от токсичного APETx2, имеющего остаток R17, важный для сохранения его ингибирующей активности, является замена этого положительно заряженного остатка на гидрофобный Leu17. Очевидно, эта мутация объясняет отсутствие у пептидов токсической активности и, вероятно, имеет важное значение при проведении фармакологических исследований. Согласно данным молекулярного моделирования и пространственным моделям пептидов, различия в величинах ингибирующей активности пептидов по отношению к разным подтипам ASICs (рис. 14, а, б) могут быть связаны с различным направлением и величиной их дипольных моментов, играющих важную роль во взаимодействиях с мишенями [56, 59].

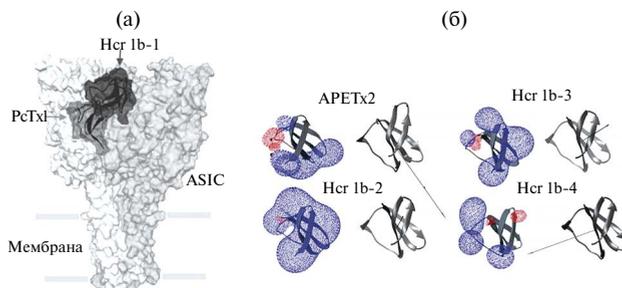


Рис. 14. Модель 3D структуры комплекса Hcr 1b-1–ASIC (а). Ленточные диаграммы моделей 3D структур молекул APETx2, Hcr 1b-2, Hcr 1b-3 и Hcr 1b-4 (б) [56, 59]. Дипольные моменты молекул показаны стрелками, эквипотенциальные поверхности (молекулярные электростатические потенциалы – МЭП) окрашены в розовый цвет (отрицательный потенциал) и синий (положительный), выполнены с помощью программ SPDBV и Chimera

Неожиданным оказалось обнаружение потенцирующего действия пептида Hmg 1b-4 при его аппликации к ASIC3 подтипу, благодаря чему он, не вызывая активацию канала, увеличивает амплитуду протон-индуцированных токов до 208% [59]. Показано, что APETx-подобные пептиды *H. crispa* оказывают выраженный обезболивающий эффект на модели кислотоиндуцированной мышечной боли, ассоциированной с функцией ASICs каналов. При этом их действующие концентрации значительно ниже, чем у анальгина [59]). В то же время анальгетическая активность пептидов была аналогична и сравнима с активностью диклофенака. При остром местном воспалении, вызванном гамма-карагинаном или полным адьювантом Фрейнда, Hmg 1b-4 показал более выраженный и статистически значимый противовоспалительный эффект, чем Hmg 1b-2. В связи с этим APETx-подобные пептиды *H. crispa* можно рассматривать в качестве перспективных анальгетиков, действие которых направлено на коррекцию активности ASICs каналов.

Заключение

Токсичные и нетоксичные пептиды, нацеленные на Na_vs, K_vs, ASICs каналы, TRP-рецепторы, компоненты цитоплазматических мембран и цитоскелета, являются молекулярными инструментами для манипуляций с этими биологическими мишенями *in vitro* и *in vivo*. Они представляют собой многообещающие лиганды для создания на их основе мутантных и рекомбинантных аналогов с заданными характеристиками, активностью и фармакологическим потенциалом, которые смогут найти терапевтическое применение при лечении многих патофизиологических состояний. На это направлены исследования, успешно проводящиеся в настоящее время сотрудниками лаборатории молекулярной фармакологии и биомедицины ТИБОХ ДВО РАН, созданной на базе ЛХП несколько лет назад.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Prentis P.J., Pavasovic A., Norton R.S. Sea anemones: quiet achievers in the field of peptide toxins // *Toxins*. 2018. Vol. 10. P. 36. <https://doi.org/10.3390/toxins10010036>.
2. Béress L. Biologically active compounds from coelenterates // *Pure Appl. Chem.* 1982. Vol. 54. P. 1981–1994. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(75\)80517-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(75)80517-5).
3. Norton R.S. Structure and structure-function relationships of sea anemone proteins that interact with the sodium channel // *Toxicon*. 1991. Vol. 29. P. 1051–1084. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(91\)90205-6](https://doi.org/10.1016/0041-0101(91)90205-6).
4. Zykova T.A., Vinokurov L.M., Kozlovskaya E.P., Elyakov G.B. Amino acid sequence of neurotoxin III from the sea anemone *Radianthus macrodactylus* // *Bioorg. Khim.* 1985. Vol. 11. P. 302–310.
5. Zykova T.A., Kozlovskaya E.P. Amino acid sequence of a neurotoxin from the sea anemone *Radianthus macrodactylus* // *Bioorg. Khim.* 1989. Vol. 15. P. 1301–1306.
6. Zykova T.A., Kozlovskaya E.P., Elyakov G.B. Amino acid sequence of neurotoxin II from the sea anemone *Radianthus macrodactylus* // *Bioorg. Khim.* 1988. Vol. 14. P. 878–882.
7. Zykova T.A., Kozlovskaya E.P., Elyakov G.B. Amino acid sequence of neurotoxins IV and V from the sea anemone *Radianthus macrodactylus* // *Bioorg. Khim.* 1988. Vol. 14. P. 1489–1494.
8. Monastyrnaya M.M., Kalina R.S., Kozlovskaya E.P. The sea anemone neurotoxins modulating sodium channels: an insight at structure and functional activity after four decades of investigation // *Toxins*. 2023. Vol. 15. P. 8. <https://doi.org/10.3390/toxins15010008>.
9. Schweitz H., Bidard J.N., Frelin C., Pauron D., Vijverberg H.P.M., Mahasneh D.M., Lazdunski M., Vibois F., Tsugita A. Purification, sequence, and pharmacological properties of sea anemone toxins from *Radianthus paumotensis*. A new class of sea anemone toxins acting on the sodium channel // *Biochemistry*. 1985. Vol. 24. P. 3554–3561. <https://doi.org/10.1021/bi00335a025>.
10. Honma T., Kawahata S., Ishida M., Nagai H., Nagashima Y., Shiomi K. Novel peptide toxins from the sea anemone *Stichodactyla haddoni* // *Peptides*. 2008. Vol. 29. P. 536–544. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.12.010>.
11. Kem W.R., Parten B., Pennington M.W., Price D.A., Dunn B.M. Isolation, characterization, and amino acid sequence of a polypeptide neurotoxin occurring in the sea anemone *Stichodactyla helianthus* // *Biochemistry*. 1989. Vol. 28. P. 3483–3489. <https://doi.org/10.1021/bi00434a050>.

12. Wunderer G., Fritz H., Wachter E., Machleidt W. Amino acid sequence of a coelenterate toxin: Toxin II from *Anemonia sulcata* // Eur. J. Biochem. 1976. Vol. 8. P. 193–198. [https://doi: 10.1111/j.1432-1033.1976.tb10778.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1976.tb10778.x).
13. Tanaka M., Hainu M., Yasunobu K.T., Norton T.R. Amino acid sequence of the *Anthopleura xanthogrammica* heart stimulant anthopleurin-A // Biochemistry. 1977. Vol. 16. 204–208. [https://doi: 10.1021/bi00621a007](https://doi.org/10.1021/bi00621a007).
14. Reimer N.S., Yasunobu C.L., Yasunobu K. T., Norton T.R. Amino acid sequence of the *Anthopleura xanthogrammica* heart stimulant, anthopleurin B // J. Biol. Chem. 1985. Vol. 260. P. 8690–8693.
15. Kalina R.S., Peigneur S., Zelepuga E.A., Dmitrenok P.S., Kvetkina A.N., Kim N.Y., Leychenko E.V., Tytgat J., Kozlovskaya E.P., Monastyrnaya M.M., Gladkikh I.N. New insights into the type II toxins from the sea anemone *Heteractis crispa* // Toxins. 2020. Vol. 12. P. 44. <https://doi.org/10.3390/toxins12010044>.
16. Baydan L.V., Kozlovskaya E.P., Tishkin S.M., Shuba M.F., Elyakov G.B. Effect of anemonotoxin on neuromuscular transmission in skeletal and smooth muscles // Dokl. Acad. Sci. USSR. 1981. Vol. 259. P. 1000–1002.
17. Sorokina Z.A., Chizhnikov I.V., Elyakov G.B., Kozlovskaya E.P., Vozhzhova E.I. Investigation of inactivation mechanism of fast sodium channels using neurotoxin from the sea anemone *Radianthus macrodactylus* and various chemical reagents // Physiol. J. 1984. Vol. 30. P. 571–579.
18. Linder R., Bernheimer A. W., Kim K. S. Interaction between sphingomyelin and a cytolysin from the sea anemone *Stoichactis helianthus* // Biochim. Biophys. Acta. 1977. Vol. 467, N3. P. 290–300.
19. Varanda W., Finkelstein A. Ion and nonelectrolyte permeability properties of channels formed in planar lipid bilayer membranes by the cytolytic toxin from the sea anemone, *Stoichactis helianthus* // J. Membr. Biol. 1980. Vol. 55, N3. P. 203–211.
20. Чантурия А.Н., Шатурский О.Я., Лишко В.К., Монастырская М.М., Козловская Э.П. Взаимодействие токсина морской актинии *Radianthus macrodactylus* с бислойными фосфолипидными мембранами // Биол. мембраны. 1990. Т. 7, № 7. С. 763–769.
21. Monastyrnaya M.M., Zykova T.A., Apalikova O.V., Shwets T.V., Kozlovskaya E.P. Biologically active polypeptides from the tropical sea anemone *Radianthus macrodactylus* // Toxicon. 2002. Vol. 40. P. 1197–1217. [https://doi: 10.1016/s0041-0101\(02\)00139-3](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(02)00139-3).
22. Ильина А.П., Монастырская М.М., Сокотун И.Н., Егоров Ц.А., Назаренко Ю.А., Лихацкая Г.Н. Актинопорины из актинии Японского моря *Oulactis orientalis*: выделение и частичная характеристика // Биоорганическая химия. 2005. Т. 31, № 1. С. 39–48.
23. Klyshko E.V., Issaeva M.P., Monastyrnaya M.M., Il'ina A.P., Guzev K.V., Vakorina T.I., Dmitrenok P.S., Zykova T.A., Kozlovskaya E.P. Isolation, properties and partial amino acid sequence of a new actinoporin from the sea anemone *Radianthus macrodactylus* // Toxicon. 2004. Vol. 44. P. 315–324. [https://doi: 10.1016/j.toxicon.2004.06.006](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.06.006).
24. Monastyrnaya M., Leychenko E., Issaeva M., Likhatskaya G., Zelepuga E., Kostina E., Trifonov E., Nurminski E., Kozlovskaya E. Actinoporins from the sea anemones, tropical *Radianthus macrodactylus* and northern *Oulactis orientalis*: Comparative analysis of structure-function relationships // Toxicon. 2010. Vol. 56. P. 1299–1314. [https://doi: 10.1016/j.toxicon.2010.07.011](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.07.011).
25. Ильина А.П., Монастырская М.М., Исаева М.П., Гузев К.В., Рассказов В.А., Козловская Э.П. Первичная структура актинопоринов актинии *Oulactis orientalis* // Биоорганическая химия. 2005. Т. 31, № 4. С. 357–362.
26. Il'ina A., Lipkin A., Barsova E., Issaeva M., Leychenko E., Guzev K., Monastyrnaya M., Lukyanov S., Kozlovskaya E. Amino acid sequence of RTX-A's isoform actinoporin from the sea anemone *Radianthus macrodactylus* // Toxicon. 2006. Vol. 47. P. 517–520. [https://doi: 10.1016/j.toxicon.2005.12.014](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.12.014).
27. Leychenko E., Isaeva M., Tkacheva E., Zelepuga E., Kvetkina A., Gusev K., Monastyrnaya M., Kozlovskaya E. Multigene family of pore-forming toxins from sea anemone *Heteractis crispa* // Mar. Drugs. 2018. Vol. 16. 183 [1–18]. <https://doi.org/10.3390/md16060183>.
28. Иванов А.С., Мольнар А.А., Монастырская М.М., Козловская Э.П. Действие токсина из *Radianthus macrodactylus* на проницаемость биологических и модельных мембран // Биол. мембраны. 1987. Т. 4, № 3. С. 243–248.
29. Козловская Э.П., Иванов А.С., Мольнар А.А., Григорьев П.А., Монастырская М.М., Халилов Э.М., Еляков Г.Б. Ионные каналы в мембранах, индуцированные гемолизом из актинии *Radianthus macrodactylus* // Докл. АН СССР. 1984. Т. 277, № 6. С. 1491–1493.
30. Bakrač B., Gutiérrez-Aguirre I., Podlesek Z., Sonnen A.F.-P., Gilbert R.J.C., Maček P., Lakey J.H., Anderluh G. Molecular determinants of sphingomyelin specificity of a eukaryotic pore-forming toxin // J. Biol. Chem. 2008. Vol. 283. P. 18665–18677. [https://doi: 10.1074/jbc.M708747200](https://doi.org/10.1074/jbc.M708747200).

31. Mechaly A.E., Bellomio A., Gil-Carton D., Morante K., Valle M., González-Mañas J.M., Guérin D.M. Structural insights into the oligomerization and architecture of eukaryotic membrane pore-forming toxins // *Structure*. 2011. Vol. 19. P. 181–191. [https://doi: 10.1016/j.str.2010.11.013](https://doi.org/10.1016/j.str.2010.11.013).
32. Bellomio A., Morante K., Barlič A., Gutiérrez-Aguirre I., Viguera A.R., González-Mañas J.M. Purification, cloning and characterization of fragaceatoxin C, a novel actinoporin from the sea anemone *Actinia fragacea* // *Toxicon*. 2009. Vol. 54. P. 869–880. [https://doi: 10.1016/j.toxicon.2009.06.022](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.06.022).
33. Mancheño J.M., Martín-Benito J., Martínez M., Gavilanes J.G., Hermoso J.A. Crystal and electron microscopy structures of Sticholysin II actinoporin reveal insights into the mechanism of membrane pore formation // *Structure*. 2003. Vol. 11. P. 1–20. [https://doi: 10.1016/j.str.2003.09.019](https://doi.org/10.1016/j.str.2003.09.019).
34. Руднев В.С., Лихацкая Г.Н., Козловская Э.П., Монастырская М.М., Еляков Г.Б. Влияние гемолизина из морской актинии *Radianthus macrodactylus* на проницаемость липидных мембран // Биол. мембраны. 1984. Т. 1, № 10. С. 1019–1023.
35. Fedorov S., Dyshlovoy S., Monastyrnaya M., Shubina L., Leychenko E., Kozlovskaya E., Jin J.O., Kwak J.Y., Bode A.M., Dong Z., Stonik V. The anticancer effects of actinoporin RTX-A from the sea anemone *Heteractis crispa* (= *Radianthus macrodactylus*) // *Toxicon*. 2010. Vol. 55. P. 811–817. [https://doi: 10.1016/j.toxicon.2009.11.016](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.11.016).
36. Kvetkina A., Malyarenko O., Pavlenko A., Dyshlovoy S., von Amsberg G., Ermakova S., Leychenko E. Sea anemone *Heteractis crispa* actinoporin demonstrates *in vitro* anticancer activities and prevents HT-29 colorectal cancer cell migration // *Molecules*. 2020. Vol. 25. 5979. [https://doi: 10.3390/molecules25245979](https://doi.org/10.3390/molecules25245979).
37. Брежестовский П.Д., Монастырская М.М., Козловская Э.П., Еляков Г.Б. Действие гемолизина из морской актинии *Radianthus macrodactylus* на мембрану эритроцитов // Докл. АН СССР. 1988. Т. 299, № 3. С. 748–750.
38. Leichenko E.V., Monastyrnaya M.M., Zelepuga E.A., Tkacheva E.S., Isaeva M.P., Likhatskaya G.N., Anastuyk S.D., Kozlovskaya E.P. Hct-A is a new actinoporin family from the *Heteractis crispa* sea anemone // *Acta Naturae*. 2014. Vol. 6. P. 89–98.
39. Monastyrnaya M.M., Agafonova I.G., Tabakmakher V.M., Kozlovskaya E.P. The sea anemone pore-forming toxins (PFTs): from mechanism of action to perspectives in pharmacology as antitumor agents // *EC Pharmacol. and Toxicol.* 2023. Vol. 11, N4. P. 20–26. DOI: 10.31080/ecpt.2023.11.00829.
40. Shnyrov V.L., Monastyrnaya M.M., Zhadan G.G., Kuznetsova S.M., Kozlovskaya E.P. Calorimetric study of interaction of toxin from *Radianthus macrodactylus* with erythrocyte membrane // *Biochem. Intern.* 1992. Vol. 26, N2. P. 219–229.
41. Зыкова Т.А., Винокуров Л.М., Маркова Л.Ф., Козловская Э.П., Еляков Г.Б. Аминокислотная последовательность ингибитора трипсина IV из *Radianthus macrodactylus* // Биоорг. химия. 1985. Т. 11. С. 293–301.
42. Isaeva M.P., Chausova V.E., Zelepuga E.A., Guzev K.V., Tabakmakher V.M., Monastyrnaya M.M., Kozlovskaya E.P. A new multigene superfamily of Kunitz-type protease inhibitors from sea anemone *Heteractis crispa* // *Peptides*. 2012. Vol. 34. P. 88–97. [https://doi.org/ 10.1016/j.peptides.2011.09.022](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.09.022).
43. Kvetkina A., Leychenko E., Chausova V., Zelepuga E., Chernysheva N., Guzev K., Pisyagin E., Yurchenko E., Menchinskaya E., Aminin D., Kaluzhskiy L., Ivanov A., Peigneur S., Tytgat J., Kozlovskaya E.P., Isaeva M.P. A new multigene HClQ subfamily from the sea anemone *Heteractis crispa* encodes Kunitz-peptides exhibiting neuroprotective activity against 6-hydroxydopamine // *Scientific Reports*. 2020. Vol. 10. P. 4205. [https://doi: 10.1038/s41598-020-61034-x](https://doi.org/10.1038/s41598-020-61034-x).
44. Сокотун И.Н., Гнеденко О.В., Лейченко Е.В., Монастырская М.М., Козловская Э.П., Мольнар А.А., Иванов А.С. Исследование взаимодействия ингибитора трипсина из актинии *Radianthus macrodactylus* с различными протеиназами // Биомед. химия. 2006. Т. 52, вып. 6. С. 595–600.
45. Gladkikh I., Monastyrnaya M., Leychenko E., Zelepuga E., Chausova V., Isaeva M., Anastuyk S., Andreev Y., Peigneur S., Tytgat J., Kozlovskaya E. Atypical reactive center Kunitz-type inhibitor from the sea anemone *Heteractis crispa* // *Mar. Drugs*. 2012. Vol. 10. P. 1545–1565. [https://doi.org/ 10.3390/md10071545](https://doi.org/10.3390/md10071545).
46. Gladkikh I., Monastyrnaya M., Zelepuga E., Sintsova O., Tabakmakher V., Gnedenko O., Ivanov A., Hua K.-F., Kozlovskaya E. New Kunitz-type HCRG polypeptides from the Sea anemone *Heteractis crispa* // *Mar. Drugs*. 2015. Vol. 13. P. 6038–6063. [https://doi: 10.3390/md13106038](https://doi.org/10.3390/md13106038).
47. Gladkikh I., Peigneur S., Sintsova O., Pinheiro-Junior E.L., Klimovich A., Menshov A., Kalinovsky A., Isaeva M., Monastyrnaya M., Kozlovskaya E., Tytgat J., Leychenko E. Kunitz-type peptides from the sea anemone *Heteractis crispa* demonstrate potassium channel blocking and anti-inflammatory activities // *Biomedicines*. 2020. Vol. 8. P. 473. [https://doi.org/ 10.3390/biomedicines8110473](https://doi.org/10.3390/biomedicines8110473).

48. Andreev Y.A., Kozlov S.A., Koshelev S.G., Ivanova E.A., Monastyrnaya M.M., Kozlovskaya E.P., Grishin E.V. Analgesic compound from sea anemone *Heteractis crispa* is the first polypeptide inhibitor of vanilloid receptor 1 (TRPV1) // *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283. P. 23914–23921. [https://doi.org/ 10.1074/jbc0.M800776200](https://doi.org/10.1074/jbc0.M800776200).
49. Monastyrnaya M., Peigneur S., Zelepuga E., Sintsova O., Gladkikh I., Leychenko E., Isaeva M., Tytgat J., Kozlovskaya E. Kunitz-type peptide HCRG21 from the sea anemone *Heteractis crispa* is a full peptide antagonist of the TRPV1 receptor // *Mar. Drugs.* 2016. Vol. 14. 229 [1–20]. [https://doi.org/ 10.3390/md14120229](https://doi.org/10.3390/md14120229).
50. Sintsova O.V., Monastyrnaya M.M., Pislyagin E.A., Menchinskaya E.S., Leychenko E.V., Aminin D.L., Kozlovskaya E.P. Anti-inflammatory activity of the polypeptide of the sea anemone *Heteractis crispa* // *Bioorg. Chem.* 2015. Vol. 41. P. 590–596.
51. Sintsova O.V., Palikov V.A., Palikova Y.A., Klimovich A.A., Gladkikh I.N., Andreev Y.A., Monastyrnaya M.M., Kozlovskaya E.P., Dyachenko I.A., Kozlov S.A., Leychenko E.V. Peptide blocker of ion channel TRPV1 exhibits a long analgesic effect in the heat stimulation model // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2020. Vol. 493. P. 215–217.
52. Sintsova O.V., Pislyagin E.A., Gladkikh I.N., Monastyrnaya M.M., Menchinskaya E.S., Leychenko E.V., Aminin D.L., Kozlovskaya E.P. Kunitz-type peptides of the sea anemone *Heteractis crispa* – potential anti-inflammatory compounds // *Bioorg. Chem.* 2017. Vol. 43. P. 105–112.
53. Sintsova O., Gladkikh I., Chausova V., Monastyrnaya M., Anastyuk S., Chernikov O., Yurchenko E., Aminin D., Isaeva M., Leychenko E., Kozlovskaya E. Peptide fingerprinting of the sea anemone *Heteractis magnifica* mucus revealed neurotoxins, Kunitz-type proteinase inhibitors and a new β -defensin α -amylase inhibitor // *Journal of Proteomics.* 2018. Vol. 173. P. 12–21. [https://doi: 10.1016/j.jprot.2017.11.019](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.11.019).
54. Sintsova O., Gladkikh I., Kalinovskii A., Zelepuga E., Monastyrnaya M., Kim N., Shevchenko ., Peigneur S., Tytgat J., Kozlovskaya E., Leychenko E. Magnificamide, a α -defensin-like peptide from the mucus of the sea anemone *Heteractis magnifica*, is a strong inhibitor of mammalian α -amylases // *Mar. Drugs.* 2019. Vol. 17. P. 542. [https://doi: 10.3390/md17100542](https://doi.org/10.3390/md17100542).
55. Tysoe C., Williams L.K., Keyzers R., Nguyen N.T., Tarling C., Wicki J., Goddard-Borger E.D., Aguda A.H., Perry S., Foster L.J., Andersen R.J., Brayer G.D., Wither S.G. Potent human α -amylase inhibition by the β -defensin-like protein Helianthamide // *ACS Cent. Sci.* 2016. Vol. 2, N3. P. 154–161. [https://doi: 10.1021/acscentsci.5b00399](https://doi.org/10.1021/acscentsci.5b00399).
56. Kalina R., Gladkikh I., Dmitrenok P., Chernikov O., Koshelev S., Kvetkina A., Kozlov S., Kozlovskaya E., Monastyrnaya M. New APETx-like peptides from sea anemone *Heteractis crispa* modulate ASIC1a channels // *Peptides.* 2018. Vol. 104. P. 41–49. [https://doi.org/ 10.1016/j.peptides.2018.04.013](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.04.013).
57. Diochot S., Baron A., Rash L.D., Deval E., Escoubas P., Scarzello S., Salinas M., Lazdunski M. A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons // *EMBO J.* 2004. Vol. 23. P. 1516–1525. [https://doi: 10.1038/sj.emboj.7600177](https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600177).
58. Osmakov D.I., Andreev Y.A., Kozlov S.A. Acid-sensing ion channels and their modulators // *Biochemistry.* 2014. Vol. 79. P. 1528–1545. [https://doi: 10.1134/S0006297914130069](https://doi.org/10.1134/S0006297914130069).
59. Kalina R.S., Koshelev S.G., Zelepuga E.A., Kim N.Y., Kozlov S.A., Kozlovskaya E.P., Monastyrnaya M.M., Gladkikh I.N. APETx-like peptides from the sea anemone *Heteractis crispa*, diverse in their effect on ASIC1a and ASIC3 ion channels // *Toxins.* 2020. Vol. 12, N4. 266 [1–20]. [https://doi.org/ 10.3390/toxins12040266](https://doi.org/10.3390/toxins12040266).

REFERENCES

1. Prentis P.J., Pavasovic A., Norton R.S. Sea anemones: quiet achievers in the field of peptide toxins. *Toxins.* 2018;10:36.
2. Béress L. Biologically active compounds from coelenterates. *Pure Appl. Chem.* 1982;54:1981–1994.
3. Norton R.S. Structure and structure-function relationships of sea anemone proteins that interact with the sodium channel. *Toxicon.* 1991;29:1051–1084.
4. Zykova T.A., Vinokurov L.M., Kozlovskaya E.P., Elyakov G.B. Amino acid sequence of neurotoxin III from the sea anemone *Radianthus macrodactylus*. *Bioorg. Khim.* 1985;11:302–310.
5. Zykova T.A., Kozlovskaya E.P. Amino acid sequence of a neurotoxin from the sea anemone *Radianthus macrodactylus*. *Bioorg. Khim.* 1989;15:1301–1306.

6. Zykova T.A., Kozlovskaya E.P., Elyakov G.B. Amino acid sequence of neurotoxin II from the sea anemone *Radianthus macrodactylus*. *Bioorg. Khim.* 1988;14:878–882.
7. Zykova T.A., Kozlovskaya E.P., Elyakov G.B. Amino acid sequence of neurotoxins IV and V from the sea anemone *Radianthus macrodactylus*. *Bioorg. Khim.* 1988;14:1489–1494.
8. Monastyrnaya M.M., Kalina R.S. Kozlovskaya E.P. The Sea anemone neurotoxins modulating sodium channels: an insight at structure and functional activity after four decades of investigation. *Toxins.* 2023;15:8.
9. Schweitz H., Bidard J.N., Frelin C., Pauron D., Vijverberg H.P.M., Mahasneh D.M., Lazdunski M., Vibois F., Tsugita A. Purification, sequence, and pharmacological properties of sea anemone toxins from *Radianthus paumotensis*. A new class of sea anemone toxins acting on the sodium channel. *Biochemistry.* 1985;24:3554–3561.
10. Honma T., Kawahata S., Ishida M., Nagai H., Nagashima Y., Shiomi K. Novel peptide toxins from the sea anemone *Stichodactyla haddoni*. *Peptides.* 2008;29:536–544.
11. Kem W.R., Parten B., Pennington M.W., Price D.A., Dunn B.M. Isolation, characterization, and amino acid sequence of a polypeptide neurotoxin occurring in the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry.* 1989;28:3483–3489.
12. Wunderer G., Fritz H., Wachter E., Machleidt W. Amino acid sequence of a coelenterate toxin: Toxin II from *Anemonia sulcata*. *Eur. J. Biochem.* 1976;8:193–198.
13. Tanaka M., Hainu M., Yasunobu K. T., Norton T.R. Amino acid sequence of the *Anthopleura xanthogrammica* heart stimulant anthopleurin-A. *Biochemistry.* 1977;16:204–208.
14. Reimer N.S., Yasunobu C.L., Yasunobu K. T., Norton T.R. Amino acid sequence of the *Anthopleura xanthogrammica* heart stimulant, anthopleurin B. *J. Biol. Chem.* 1985;260:8690–8693.
15. Kalina R.S., Peigneur S., Zelepuga E.A., Dmitrenok P.S., Kvetkina A.N., Kim N.Y., Leychenko E.V., Tytgat J., Kozlovskaya E.P., Monastyrnaya M.M., Gladkikh I.N. New insights into the type II toxins from the sea anemone *Heteractis crispa*. *Toxins.* 2020;12:44.
16. Baydan L.V., Kozlovskaya E.P., Tishkin S.M., Shuba M.F., Elyakov G.B. Effect of anemonotoxin on neuromuscular transmission in skeletal and smooth muscles. *Dokl. Acad. Sci. USSR.* 1981;259:1000–1002.
17. Sorokina Z.A., Chizhnikov I.V., Elyakov G.B., Kozlovskaya E.P., Vozhzhova E.I. Investigation of inactivation mechanism of fast sodium channels using neurotoxin from the sea anemone *Radianthus macrodactylus* and various chemical reagents. *Physiol. J.* 1984;30:571–579.
18. Linder R., Bernheimer A.W., Kim K.S. Interaction between sphingomyelin and a cytolytic toxin from the sea anemone *Stoichactis helianthus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1977;467(3):290–300.
19. Varanda W., Finkelstein A. Ion and nonelectrolyte permeability properties of channels formed in planar lipid bilayer membranes by the cytolytic toxin from the sea anemone, *Stoichactis helianthus*. *J. Membr. Biol.* 1980;55(3):203–211.
20. Chanturia A.N., Shatursky O. Ya., Lishko V.K., Monastyrnaya M.M., Kozlovskaya E.P. Vsaimejstvie toxina morskogo aktinii *Radianthus macrodactylus* s bislojnymi fosfolipidnimi membranami = [Interaction of the sea anemone toxin *Radianthus macrodactylus* with bilayer phospholipid membranes]. *Biol. membrani.* 1990;7(7):763–769. (In Russ.).
21. Monastyrnaya M.M., Zykova T.A., Apalikova O.V., Shwets T.V., Kozlovskaya E.P. Biologically active polypeptides from the tropical sea anemone *Radianthus macrodactylus*. *Toxicon.* 2002;40:1197–1217.
22. Ilyina A.P., Monastyrnaya M.M., Sokotun I.N., Egorov T.A., Nazarenko Yu.A., Likhatskaya G.N. Aktinoporini iz aktinii Japonskogo morja *Oulactis orientalis*: videlenie i chastichnaja karakteristika = [Actinoporins from the Sea of Japan sea anemone *Oulactis orientalis*: isolation and partial characterization]. *Bioorg. chimija.* 2005;31:39–48. (In Russ.).
23. Klyshko E.V., Issaeva M.P., Monastyrnaya M.M., Il'ina A.P., Guzev K.V., Vakorina T.I., Dmitrenok P.S., Zykova T.A., Kozlovskaya E.P. Isolation, properties and partial amino acid sequence of a new actinoporin from the sea anemone *Radianthus macrodactylus*. *Toxicon.* 2004;44:315–324.
24. Monastyrnaya M., Leychenko E., Issaeva M., Likhatskaya G., Zelepuga E., Kostina E., Trifonov E., Nurminski E., Kozlovskaya E. Actinoporins from the sea anemones, tropical *Radianthus macrodactylus* and northern *Oulactis orientalis*: Comparative analysis of structure-function relationships. *Toxicon.* 2010;56:1299–1314.
25. Il'ina A.P., Monastyrnaya M.M., Issaeva M.P., Guzev K.V., Rasskasov V.A., Kozlovskaya E.P. Primary structure of actinoporins from the sea anemone *Oulactis orientalis*. *Bioorg. Chem.* 2005;31:357–362.
26. Il'ina A., Lipkin A., Barsova E., Issaeva M., Leychenko E., Guzev K., Monastyrnaya M., Lukyanov S., Kozlovskaya E. Amino acid sequence of RTX-A's isoform actinoporin from the sea anemone *Radianthus macrodactylus*. *Toxicon.* 2006;47:517–520.

27. Leychenko E., Isaeva M., Tkacheva E., Zelepuga E., Kvetkina A., Gusev K., Monastyrnaya M., Kozlovskaya E. Multigene family of pore-forming toxins from sea anemone *Heteractis crispa*. *Mar. Drugs*. 2018;16: 183 [1–18].
28. Ivanov A.S., Molnar A.A., Monastyrnaya M.M., Kozlovskaya E.P. Deystvie toksina is *Radianthus macrodactylus* na pronizaemost biologicheskikh i modelnich membran = [Effect of toxin from *Radianthus macrodactylus* on the permeability of biological and model membranes]. *Biol. Membrani*. 1987;4(3):243–248. (In Russ.).
29. Kozlovskaya E.P., Ivanov A.S., Molnar A.A., Grigoriev P.A., Monastyrnaya M.M., Chalilov E.M., Elyakov G.B. Ionnie kanali v membranach, induzirovannie gemolisinom is aktinii *Radianthus macrodactylus* = [Ion channels in membranes induced by hemolysin from the sea anemone *Radianthus macrodactylus*]. *Dokl. AN SSSR*. 1984;277(6):1491–1493. (In Russ.).
30. Bakrač B., Gutiérrez-Aguirre I., Podlesek Z., Sonnen A.F.-P., Gilbert R.J.C., Maček P., Lakey J.H., Anderluh G. Molecular determinants of sphingomyelin specificity of a eukaryotic pore-forming toxin. *J. Biol. Chem*. 2008;283:18665–18677.
31. Mechaly A.E., Bellomio A., Gil-Carton D., Morante K., Valle M., González-Mañás J.M., Guérin D.M. Structural insights into the oligomerization and architecture of eukaryotic membrane pore-forming toxins. *Structure*. 2011;19:181–191.
32. Bellomio A., Morante K., Barlič A., Gutiérrez-Aguirre I., Viguera A.R., González-Mañás J.M. Purification, cloning and characterization of fragaceatoxin C, a novel actinoporin from the sea anemone *Actinia fragacea*. *Toxicon*. 2009;54:869–880.
33. Mancheño J.M., Martín-Benito J., Martínez M., Gavilanes J.G., Hermoso J.A. Crystal and electron microscopy structures of Sticholysin II actinoporin reveal insights into the mechanism of membrane pore formation. *Structure*. 2003;11:1–20.
34. Rudnev V.C., Likhatskaya G.N., Kozlovskaya E.P., Monastyrnaya M.M., Elyakov G.B. Vliyanie gemolisina is morskoj aktinii *Radianthus macrodactylus* na pronizaemost lipidnich membrane = [Effect of hemolysin from the sea anemone *Radianthus macrodactylus* on the permeability of lipid membranes]. *Biol. Membrani*. 1984;1(10):1019–1023. (In Russ.).
35. Fedorov S., Dyshlovoy S., Monastyrnaya M., Shubina L., Leychenko E., Kozlovskaya E., Jin J.O., Kwak J.Y., Bode A.M., Dong Z., Stonik V. The anticancer effects of actinoporin RTX-A from the sea anemone *Heteractis crispa* (= *Radianthus macrodactylus*). *Toxicon*. 2010;55:811–817.
36. Kvetkina A., Malyarenko O., Pavlenko A., Dyshlovoy S., von Amsberg G., Ermakova S., Leychenko E. Sea anemone *Heteractis crispa* actinoporin demonstrates *in vitro* anticancer activities and prevents HT-29 colorectal cancer cell migration. *Molecules*. 2020;25:5979.
37. Brezhestovsky P.D., Monastyrnaya M.M., Kozlovskaya E.P., Elyakov G.B. Deystvie gemolisina is morskoj aktinii *Radianthus macrodactylus* na membranu eritrozitov = [Effect of hemolysin from the sea anemone *Radianthus macrodactylus* on the erythrocyte membrane]. *Dokl. AN USSR*. 1988;299(3):748–750. (In Russ.)
38. Leichenko E.V., Monastyrnaya M.M., Zelepuga E.A., Tkacheva E.S., Isaeva M.P., Likhatskaya G.N., Anastyuk S.D., Kozlovskaya E.P. Hct-A is a new actinoporin family from the *Heteractis crispa* sea anemone. *Acta Naturae*. 2014;6:89–98.
39. Monastyrnaya M.M., Agafonova I.G., Tabakmakher V.M., Kozlovskaya E.P. The sea anemone pore-forming toxins (PFTs): from mechanism of action to perspectives in pharmacology as antitumor agents. *EC Pharmacol. and Toxicol*. 2023;11(4):20–26.
40. Shnyrov V.L., Monastyrnaya M.M., Zhadan G.G., Kuznetsova S.M., Kozlovskaya E.P. Calorimetric study of interaction of toxin from *Radianthus macrodactylus* with erythrocyte membrane. *Biochem. Intern*. 1992;26(2):219–229.
41. Zykova T.A., Vinokurov L.M., Markova L.F., Kozlovskaya E.P., Elyakov G.B. Aminokislottayaya posledovatelnost ingibitora tripsins IV is *Radianthus macrodactylus* = [Amino acid sequence of trypsin inhibitor IV from *Radianthus macrodactylus*]. *Bioorg. Khimia*. 1985;11:293–301. (In Russ.).
42. Isaeva M.P., Chausova V.E., Zelepuga E.A., Guzev K.V., Tabakmakher V.M., Monastyrnaya M.M., Kozlovskaya E.P. A new multigene superfamily of Kunitz-type protease inhibitors from sea anemone *Heteractis crispa*. *Peptides*. 2012;34:88–97.
43. Kvetkina A., Leychenko E., Chausova V., Zelepuga E., Chernysheva N., Guzev K., Pisyagin E., Yurchenko E., Menchinskaya E., Aminin D., Kaluzhskiy L., Ivanov A., Peigneur S., Tytgat J., Kozlovskaya E.P., Isaeva M.P. A new multigene HClQ subfamily from the sea anemone *Heteractis crispa* encodes Kunitz-peptides exhibiting neuroprotective activity against 6-hydroxydopamine. *Scientific Reports*. 2020;10:4205.

44. Sokotun I.N., Gnedenko O.V., Leichenko E.V., Monastyrnaya M.M., Kozlovskaya E.P., Molnar A.A., Ivanov A.S. Issledovanie vsaimodejstviya ingibitora tripsina is aktinii *Radianthus macrodactylus* s raslichnimi proteinasami = [Study of the interaction of trypsin inhibitor from the sea anemone *Radianthus macrodactylus* with various proteinases]. *Biomed. Khimia*. 2006;52(6):595–600. (In Russ.).
45. Gladkikh I., Monastyrnaya M., Leychenko E., Zelepuga E., Chausova V., Isaeva M., Anastyuk S., Andreev Y., Peigneur S., Tytgat J., Kozlovskaya E. Atypical reactive center Kunitz-type inhibitor from the sea anemone *Heteractis crispa*. *Mar. Drugs*. 2012;10:1545–1565.
46. Gladkikh I., Monastyrnaya M., Zelepuga E., Sintsova O., Tabakmakher V., Gnedenko O., Ivanov A., Hua K.-F., Kozlovskaya E. New Kunitz-type HCRG polypeptides from the sea anemone *Heteractis crispa*. *Mar. Drugs*. 2015;13:6038–6063.
47. Gladkikh I., Peigneur S., Sintsova O., Pinheiro-Junior E.L., Klimovich A., Menshov A., Kalinovskiy A., Isaeva M., Monastyrnaya M., Kozlovskaya E., Tytgat J., Leychenko E. Kunitz-type peptides from the sea anemone *Heteractis crispa* demonstrate potassium channel blocking and anti-inflammatory activities. *Biomedicines*. 2020;8:473.
48. Andreev Y.A., Kozlov S.A., Koshelev S.G., Ivanova E.A., Monastyrnaya M.M., Kozlovskaya E.P., Grishin E.V. Analgesic compound from sea anemone *Heteractis crispa* is the first polypeptide inhibitor of vanilloid receptor 1 (TRPV1). *J. Biol. Chem*. 2008;283:23914–23921.
49. Monastyrnaya M., Peigneur S., Zelepuga E., Sintsova O., Gladkikh I., Leychenko E., Isaeva M., Tytgat J., Kozlovskaya E. Kunitz-type peptide HCRG21 from the sea anemone *Heteractis crispa* is a full peptide antagonist of the TRPV1 receptor. *Mar. Drugs*. 2016;14: 229 [1–20].
50. Sintsova O.V., Monastyrnaya M.M., Pisyagin E.A., Menchinskaya E.S., Leychenko E.V., Aminin D.L., Kozlovskaya E.P. Anti-inflammatory activity of the polypeptide of the sea Anemone, *Heteractis crispa*. *Bioorg. Chem*. 2015;941:590–596.
51. Sintsova O.V., Palikov V.A., Palikova Y.A., Klimovich A.A., Gladkikh I.N., Andreev Y.A., Monastyrnaya M.M., Kozlovskaya E.P., Dyachenko I.A., Kozlov S.A., Leychenko E.V. Peptide blocker of ion channel TRPV1 exhibits a long analgesic effect in the heat stimulation model. *Dokl. Biochem. Biophys*. 2020;493:215–217.
52. Sintsova O.V., Pisyagin E.A., Gladkikh I.N., Monastyrnaya M.M., Menchinskaya E.S., Leychenko E.V., Aminin D.L., Kozlovskaya E.P. Kunitz-type peptides of the sea anemone *Heteractis crispa* – potential anti-inflammatory compounds. *Bioorg. Chem*. 2017;43:105–112.
53. Sintsova O., Gladkikh I., Chausova V., Monastyrnaya M., Anastyuk S., Chernikov O., Yurchenko E., Aminin D., Isaeva M., Leychenko E., Kozlovskaya E. Peptide fingerprinting of the sea anemone *Heteractis magnifica* mucus revealed neurotoxins, Kunitz-type proteinase inhibitors and a new β -defensin α -amylase inhibitor. *Journal of Proteomics*. 2018;173:12–21.
54. Sintsova O., Gladkikh I., Kalinovskii A., Zelepuga E., Monastyrnaya M., Kim N., Shevchenko L., Peigneur S., Tytgat J., Kozlovskaya E., Leychenko E. Magnificamide, a α -defensin-like peptide from the mucus of the sea anemone *Heteractis magnifica*, is a strong inhibitor of mammalian α -amylases. *Mar. Drugs*. 2019;17:542.
55. Tysoe C., Williams L.K., Keyzers R., Nguyen N.T., Tarling C., Wicki J., Goddard-Borger E.D., Aguda A.H., Perry S., Foster L.J., Andersen R.J., Brayer G.D., Wither S.G. Potent human α -amylase inhibition by the β -defensin-like protein Helianthamide. *ACS Cent. Sci*. 2016;2(3):154–161.
56. Kalina R., Gladkikh I., Dmitrenok P., Chernikov O., Koshelev S., Kvetkina A., Kozlov S., Kozlovskaya E., Monastyrnaya M. New APETx-like peptides from sea anemone *Heteractis crispa* modulate ASIC1a channels. *Peptides*. 2018;104:41–49.
57. Diochot S., Baron A., Rash L.D., Deval E., Escoubas P., Scarzello S., Salinas M., Lazdunski M. A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. *EMBO J*. 2004;23:1516–1525.
58. Osmakov D.I., Andreev Y.A., Kozlov S.A. Acid-sensing ion channels and their modulators. *Biochemistry*. 2014;79:1528–1545.
59. Kalina R.S., Koshelev S.G., Zelepuga E.A., Kim N.Y., Kozlov S.A., Kozlovskaya E.P., Monastyrnaya M.M., Gladkikh I.N. APETx-like peptides from the sea anemone *Heteractis crispa*, diverse in their effect on ASIC1a and ASIC3 ion channels. *Toxins*. 2020;12(4). 266 [1–20].