

МОЛЕКУЛЯРНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ЯДА ПАУКОВ

©2009 г. А. А. ВАСИЛЕВСКИЙ, С. А. КОЗЛОВ,
Е. В. ГРИШИН

*Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва*

I. Введение. II. Состав ядов пауков. III. Низкомолекулярные компоненты. IV. Линейные пептиды. V. Дисульфид-содержащие пептиды. VI. Белковые компоненты. VII. Биосинтез компонентов ядов пауков. VIII. Заключение. IX. Приложение. Некоторые факты биологии пауков.

I. ВВЕДЕНИЕ

Обзорная статья посвящена яду пауков – фактору, сыгравшему решающую роль в эволюции этой одной из наиболее успешных групп живых существ (некоторые факты биологии пауков приведены в конце статьи в специальном приложении). На наш взгляд, именно в производстве яда пауки достигли невиданного совершенства, и здесь особенно ярко проявляется их биологическое многообразие. Яды пауков представляют собой сложные смеси биологически активных соединений различной химической природы – от солей до больших многодоменных белков. В составе одного яда можно обнаружить более сотни разных компонентов, и по этому показателю пауки – лидеры живой природы. Состав яда в ходе длительной эволюции постоянно

Принятые сокращения: а.о. – аминокислотный остаток; АМП – антимикробный пептид; АП – ацилполиамин; ЛД₅₀ – средняя летальная доза; Мм – молекулярная масса; ЦП – цитолитический пептид; ЭР – эндоплазматический ретикулум; ЯМР – ядерный магнитный резонанс; C α β – мотив «цистеин-стабилизированных α -спирали- β -слоя»; DDH – мотив «дисульфид-направленной β -шпильки»; ESM – дополнительный структурный мотив; ICK – мотив «цистинового узла»; PSM – основной структурный мотив.

Адрес для корреспонденции: grev@ibch.ru; avas@ibch.ru

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 08-04-00454 и № 08-04-90444), Федерального агентства по науке и инновациям РФ (грант НШ-639.2008.4; Государственный контракт № 02.512.12.2020 от 27.06.2008), Федерального агентства по образованию РФ (Государственный контракт П 1388 от 02.09.2009), а также Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

совершенствовался и настраивался, чтобы эффективно выполнять функцию убийства или парализации жертвы и отпугивания агрессора. Различные компоненты яда работают в синергизме, обеспечивая эффективность действия смеси. Состав яда весьма видоспецифичен и зависит от многих факторов: пола, питания, ареала обитания пауков, климата и т.д. [1–9]. Пауки экономно расходуют свой яд и научились точно рассчитывать его дозировку в зависимости от размеров жертвы и ее устойчивости к яду. Если необходимое для данного объекта охоты количество яда превышает по размеру их запасы, то они благоразумно отступают [6, 10–12]. Основными природными мишенями ядов пауков служат насекомые. Специфичность действия некоторых токсинов пауков уникальна: при высокой токсичности для насекомых эти соединения абсолютно безвредны для представителей других таксонов, что может служить основой для создания инсектицидов нового поколения [13–16]. Хотя абсолютное большинство пауков ядовиты, они, как правило, не опасны для людей или причиняют не больший вред, чем комары или осы; лишь несколько видов пауков представляют реальную угрозу для человека (табл. 1) [17]. Яды пауков оказались источниками высокоспецифичных веществ, действующих на различные системы мембранного транспорта – ионные каналы, ионотропные рецепторы и др. Эти вещества являются незаменимыми инструментами в изучении мембранных систем и повсеместно используются в современной нейробиологии. Учитывая видовое разнообразие пауков, а также сложный состав ядов, среди их компонентов можно с высокой вероятностью найти специфичный модулятор практически любой мембранной транспортной системы, который может быть применен не только в фундаментальных исследованиях, но и в медицине для лечения заболеваний, связанных с нарушением функции этой системы [7, 18–29].

В настоящем обзоре рассмотрены результаты исследований состава ядов пауков, структуры и свойств их отдельных компонентов. Особое внимание уделено белковым и пептидным молекулам яда, процессам их биосинтеза, механизмам действия и применению в фармакологии.

II. СОСТАВ ЯДОВ ПАУКОВ

Из всего многообразия пауков яды были исследованы лишь у представителей около ста видов, а тщательно изучены только у нескольких из них. Прежде всего, это, конечно, пауки, имеющие медицинское значение (табл. 1), а также некоторые из представителей, ставших стандартными объектами арахнологов широкого профиля или

Таблица 1.
Пауки, представляющие непосредственную угрозу
для здоровья человека

Название пауков	Основное действующее начало	Симптомы при укусе
Пауки-«вдовы» из рода <i>Latrodectus</i> (Theridiidae)	α -Латротоксин, белковый нейротоксин, вызывает истощающий выброс нейромедиаторов, см. главу VI	«Латродектизм»: боль, не утихающая в течение от часов до дней, с неспецифическими системными эффектами, возможен летальный исход ¹
Пауки-«отшельники» из рода <i>Loxosceles</i> (Sicariidae)	Фермент фосфолипаза D (сфингомиелиназа D), некротический токсин, см. главу VI	«Локсосцелизм»: кожные поражения различной степени тяжести – от незначительного раздражения до серьезных язв и развития системного гемолиза, приводящего к смерти ²
«Странствующие» пауки из рода <i>Phoneutria</i> (Ctenidae)	Пептидные нейротоксины, действующие на натриевые каналы, см. главу V	Боль в месте укуса, приапизм, брадикардия, снижение давления с угрозой для жизни
Австралийские «воронковые» пауки из родов <i>Atrax</i> и <i>Hadronyche</i> (Hexathe-lidae)	δ -Атракотоксины, пептидные нейротоксины, действующие на натриевые каналы, см. главу V	Наиболее опасные для человека пауки, укусы вызывают местные и системные эффекты различной тяжести: боль в месте укуса, парестезия, мышечный спазм, общее возбуждение, повышение давления, нарушение сердечного ритма, кома, смерть

¹ При укусах пауками из рода *Steatoda* («ложные вдовы») того же семейства Theridiidae развивается стеатодизм – легкая форма латродектизма.

² Пауки из рода *Sicarius* того же семейства Sicariidae, по-видимому, производят даже более опасный яд, чем представители рода *Loxosceles*, однако случаи укусов людей не документированы ввиду обитания этих пауков в пустынях.

традиционных для фауны определенных стран – родины научных коллективов [6, 7, 16, 30–34].

Яды пауков – сложные многокомпонентные смеси биологически активных веществ, служащих общей цели, атакующей (убийство/парализация жертвы) и/или защитной (отпугивание агрессора) [1, 2]. Как в том, так и в другом случае яды пауков могут вызывать паралич или сильную боль. По характеру действия выделяют две большие группы ядов: нейротоксические и некротические (цитолитические), хотя эти эффекты могут проявляться одновременно. В состав ядов пауков входят вещества различной химической природы, которые можно условно разделить на три группы по молекулярной массе

Таблица 2.
Основные компоненты ядов пауков

Тип основного компонента яда		Пример
Низкомолекулярные вещества	ацилполиамины	семейство Araneidae, пауки-«кругопряды», см. главу III [68]
	цитолитики	семейство Zodariidae, пауки-«муравьеды», см. главу IV [62, 63]
Пептиды	нейротоксины	большинство изученных пауков, см. главу V
	ферменты	семейство Sicariidae, в том числе пауки-«отшельники», см. главу VI [33, 57]
Белки	нейротоксины	семейство Theridiidae, в том числе пауки-«вдовы», см. главу VI [34]

(Мм). (1) Низкомолекулярные (<1 кДа) вещества разнообразного строения. (2) Пептиды (1–10 кДа). В этой группе выделяют две основные структурно-функциональные подгруппы – дисульфид-содержащие нейротоксины и линейные цитолитические пептиды (ЦП). (3) Высокомолекулярные (>10 кДа) вещества – различные белки, в том числе ферменты и нейротоксины.

Общее число индивидуальных компонентов ядов пауков, исследованных с использованием таких методов протеомики и пептидомики, как двумерный электрофорез, многомерная хроматография, различные типы масс-спектрометрии и т.д., а также генетических методов, может превышать тысячу, поэтому их изучение представляет сложную задачу [4, 18, 23, 28, 29, 35–38]. Несмотря на чрезвычайное разнообразие химического строения и биологических функций, часто предпочтение отдается лишь одному из типов компонентов яда. В настоящее время известны пауки, предпочтительно производящие каждую из перечисленных групп веществ (табл. 2). В среднем, яды пауков содержат ~25% полипептидов по весу, а концентрация мажорных токсических компонентов – ацилполиаминов (АП) и полипептидов – достигает десятков мМ [7, 8, 37, 38].

Большинство изученных пауков производят яд с преобладанием дисульфид-содержащих пептидных нейротоксинов, которым посвящена глава V данного обзора. Многие из этих веществ, в свою очередь, характеризуются общим цистеиновым мотивом первичной структуры и относятся к т.н. «ноттинам» – пептидным молекулам, формирующим в пространстве структуру «цистеинового узла» [39–43]. В одном яде могут присутствовать до нескольких сотен молекул ноттинов со сходной пространственной структурой, стабилизированной инвариантными остатками полуцистина. Специфичность

действия каждой молекулы определяется уникальной комбинацией переменных аминокислотных остатков (а.о.), расположенных в петлевых участках между дисульфидными мостами (табл. 3, 4). Такие ансамбли пептидных молекул ядов принято называть природными комбинаторными библиотеками биологически активных веществ [3, 16, 44–48]. Похожие «библиотеки» встречаются в ядах и других животных, например, змей, скорпионов, моллюсков конусов и морских анемонов, однако для этих случаев характерны другие мотивы аминокислотной последовательности и реализуются иные типы пространственной структуры молекул [49–54].

Известно, по крайней мере, четыре исключения из описанной стратегии формирования компонентного состава ядов (табл. 2). (а) Пауки-«вдовы» из рода *Latrodectus* продуцируют высокоспециализированные белковые нейротоксины, латротоксины (глава VI) [34]. Это свойство характерно также и для других представителей семейства Theridiidae, пауков-«тенетников», например, из рода *Steatoda* [55]. Отметим, что другим «классическим» примером сложных белковых нейротоксинов служат столбнячный и ботулинический токсины бактерий из рода *Clostridium* [56]. (б) В яде пауков из семейства Sicariidae (в частности, пауков-«отшельников» из рода *Loxosceles*) содержатся различные ферменты, в том числе фосфолипаза D (глава VI) [33, 57]. Это свойство сближает «отшельников» с патогенными бактериями из рода *Corynebacterium* [58, 59]. Напомним также, что важным компонентом ядов пчел и змей являются фосфолипазы A₂ [60, 61]. (в) Пауки-«муравьеды» центральноазиатского вида *Lachesana tarabaevi* (семейство Zodariidae) продуцируют яд с выраженным цитолитическим действием, обусловленным наличием множества разнообразных ЦП (глава IV) [62, 63]. Это свойственно и другим членистоногим – пчелам, шмелям, осам и муравьям [38, 60, 64–67]. (г) Наконец, пауки-«кругопряды» из семейства Araneidae производят разнообразные ацилполиаминные нейротоксины со средней специфичностью действия (глава III) [68]. АП обнаружены также в ядах ос [35, 68]. Итак, в случаях (а) и (б) предпочтение отдается белковым компонентам, в случае (в) – пептидам, а в случае (г) – полиаминам. Любой из этих типов яда может обладать нейротоксическим действием, в то время как для некротических (цитолитических) ядов характерно наличие полипептидных компонентов.

Для некоторых пауков характерен «промежуточный» тип состава яда или «репертуар» вырабатываемых токсинов. Например, представители надсемейства Lycosoidea производят яды с высоким содержанием ЦП, но большая и/или функционально более важная

Таблица 3.
Комбинаторика дисульфид-содержащих пептидов в яде паука
(на примере *Chilobrachys jingzhao*)

Пептид	Аминокислотная последовательность	число а.о.
JZTX-VIII	---LFE C SFS C DIKKNGKP---CKGSEK C SGGWR--- C KMNF C VKV---	39
JZTX-50	---GR C IEEGKW---CPKKAP--- C CGRLE---CKGPS P KQKK--- C TRP---	35
JZTX-51	---R C FSGKP---CRPLMRIP--- C CGS--- C VRGK--- C A---	27
JzTx-V	---Y C QKWMT--- C DSKRA--- C CEGLR--- C KLW--- C RKIIG---	30
JzTx-I	---AC G QFWK--- C GEGPPP--- C CANFA--- C KIGLYL--- C IWSP---	33
JzTx-III	---D E CGGF W WK--- C GRGAPP--- C CKGYA--- C SKTWG--- C AVEAP---	36
JzTx-VII	---G C GLMAG--- C DGKSTF--- C CSGYN--- C SPTWKW--- C VYARP---	34
JZTX-49	---G C GLMDA--- C DGKSTF--- C CSGYN--- C SPTWKW--- C VLD C PNL F LP P TK T LC---	46
JzTx-XI	---E C RK M FGG--- C SVSDS--- C CAHLG--- C KPTLY--- C AWD G T F GK---	36
JZTX-21	--- C GG W MAK--- C ADSDS--- C CETFH--- C TRFNV--- C GK---	28
JZTX-54	---S C IER M QT--- C VEAGLP--- C CSGAP--- C I P Y I GD C I--- C IQ---	35
JZTX-56	NSR Q K R C W GANVP--- C EDEN S P--- C CSPLK--- C E K T F Y G W W Y G S P F C V R S G S G ---	48
JZTX-58	---Q R AC G HL H DP--- C PND R P G H R T C I G L Q --- C RYGS--- C L V Q V GR---	38
JZTX-60	---E C R F W G A--- C KSDSD--- C CRYLG--- C KRW E NI--- C L W SP W G---	35
JZTX-62	---S C IE W K T --- C ES S E--- C CGS S TI--- C S T W A E G KE I KL--- C K N E G G T F K K V L H F I Q K I S K L K S C K E G N ---	63
JZTX-64	---A C SK K A G E K C K S N C D--- C CG S T L --- C G I T E G K E V K Y Q--- C M S K T S N N K I N T V G L G V N A I E N M L S F C F R---	65
JZTX-66	---G D D G T C I L L K G D H--- C H G T C D--- C CG W T T --- C R K S K S A G G K I --- C K S E G S S I S A F N A I A K G V A A M K K A C C K H K S G---	67

Пример молекулярного разнообразия компонентов яда пауков (по [48]).

Приведены аминокислотные последовательности пептидов, относящихся к различным семействам. Остатки цистеина отмечены затемнением. Снизу показано расположение дисульфидных связей в мотиве цистинового узла.

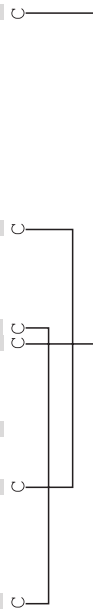


Таблица 4.
Комбинаторика дисульфид-содержащих пептидов в яде паука
(на примере *Agelena orientalis*)

Пептид	Аминокислотная последовательность	число а.о.
μ-agel-4	G-CVGENQQCADWAGPHCCSGYYCTCRYFPKCI CRKDSGK	39
μ-agel-10	G-CVGENQQCANWAGPHCCSGYYCTCRYFPKCI CRKDSGK	39
μ-agel-12	G-CVGENQQCADWAGLHCCSGYYCTCRYFPKCI CRKDSGK	39
μ-agel-11	G-CVGENQQCADWARPHCCSGYYCTCRYFPKCI CRKDSGK	39
μ-agel-6	G-CVGENQQCADWAGPHCCSGYYCTCRYFPKCI CVNDNGK	39
μ-agel-7	GDCVGESQQCADWSGPYCCKGYYCTCRYFPKCI CVNDNGK	40
μ-agel-9	GDCVGESQQCADWSGPYCCKGYYCTCQYFPKCI CVNDNGK	40
μ-agel-8	GGCVGESQQCADWSGPYCCKGYYCTCRYFPKCI CVNDNGK	40
μ-agel-3	AECVGDGQRCADWAGPYCCSGYYCSRSMPYCRCRSDSGK	40
μ-agel-5	TDCVGDGQRCADWAGPYCCSGYYCSRSMPYCRCRSDSGK	40
μ-agel-1	-ECAAANKRCADWAGPWCC EGLYCSRSYFGCMCRPNSG-	38
μ-agel-13	-DCVGENGRCRDWYN-DCCDGFYCSRQPPYICRNNG-	37
μ-agel-14	-ECVGENGHCRSWYN-DCCDGYYSQMPPNCRNNG-	37

Пример молекулярного разнообразия компонентов яда пауков (по [45]).

Приведены аминокислотные последовательности пептидов, относящихся к одному семейству. Остатки цистеина отмечены бледным затемнением, различающиеся остатки – насыщенным затемнением. Снизу показано расположение дисульфидных связей.

часть их ядов представлена цистеин-содержащими нейротоксинами ноттинового типа, в некоторых случаях отмечено присутствие значительного количества АП [18, 28, 38, 69–72]. Наличие в яде одновременно высоких концентраций полиаминных и пептидных нейротоксинов характерно для пауков различных систематических групп [7, 18, 28, 73]. В яде пауков присутствует множество белковых компонентов, главным образом ферментов, однако с функциональной точки зрения эти вещества рассматривают как дополнительные, за исключением упомянутых выше случаев [4, 31, 32, 74].

В ходе эволюции ядовитых животных произошла тонкая «настройка» компонентного состава ядов, наиболее эффективно обеспечивающая функцию нападения и/или защиты. По-видимому, в эволюции возникли две главные стратегии формирования состава ядов. Одна из них выработана медоносной пчелой и основана на использовании ограниченного числа активных молекул. Основные компоненты яда пчелы – пептид мелиттин и фермент фосфолипаза A_2 – являются цитолитическими веществами широкого спектра действия [60, 67]. Другая стратегия характерна для большинства исследованных ядови-

тых животных и подразумевает широкое «биомолекулярное» разнообразие компонентов яда [75].

Предполагается, что используются, по крайней мере, четыре фактора при эволюционной оптимизации ядов различного химического состава [8, 38, 62, 76]. (1) Функциональное разнообразие, основанное на продукции молекул, действующих на различные мишени. Это обеспечивает резкое возрастание числа потенциальных жертв и снижает вероятность выработки ими устойчивости к яду. Например, в яде североамериканского «воронкового» паука *Agelenopsis aperta* (семейство Agelenidae) содержатся α -агатоксины (АП, ингибирующие глутаматные рецепторы и, соответственно, препятствующие сокращению мышечных клеток насекомых), μ -агатоксины (пептидные нейротоксины, модуляторы-активаторы натриевых каналов в мембранах нейрональных клеток насекомых, способствуют выбросу нейромедиаторов) и ряд ω -агатоксинов (пептидные нейротоксины, блокаторы кальциевых каналов в нейронах, препятствуют выбросу нейромедиаторов), по-разному действующих на различные каналы насекомых и позвоночных [7]. (2) Селективность и эффективность, а именно, отбор токсинов как высокоточного оружия, действующих наиболее специфично и мощно. Благодаря такому отбору в руках исследователей оказались молекулы, селективно узнающие определенные мишени. Например, ω -агатоксины IVA и IVB являются повсеместно используемыми диагностическими лигандами Ca^{2+} -каналов R-типа [24, 77–79]. (3) Синергизм: различные по структуре и механизму действия компоненты усиливают функции друг друга при совместном использовании. При этом эффективная действующая концентрация отдельных компонентов значительно снижается. Известны примеры синергизма функций различных групп компонентов яда [6–8, 71, 76, 80, 81]. Например, синергизм действия отмечен между солями калия, гистамином, цитолитическими и нейротоксическими пептидными компонентами яда центральноамериканского «странствующего» паука *Cupiennius salei* (Ctenidae) [6, 8, 80]. Концепция «групп заговорщиков» (англ. sabals), разработанная для токсинов моллюсков конусов и подразумевающая согласованность действия нескольких типов компонентов яда для достижения определенного физиологического эффекта [82, 83], на наш взгляд, верна и для ядов пауков. Например, α - и μ -агатоксины из яда паука *A. aperta* образуют одну группу заговорщиков, вызывающую быстрый паралич [76]. Другая группа сформирована медленно действующими ω -агатоксинами, которые вызывают длительный вялый паралич [7, 84]. (4) Биомолекулярное разнообразие подразумевает продукцию целых множеств компонентов со сходной функцией и структурой, отличающихся специфич-

ностью и механизмом действия [75]. Как уже отмечалось, согласно современным представлениям, пептидные компоненты ядов многих пауков, скорпионов, анемонов, моллюсков и змей составляют т.н. природные комбинаторные библиотеки биологически активных молекул, отобранных в процессе эволюции [16, 44–54]. Этот фактор наиболее характерен для пептидных нейротоксинов, однако он важен и для эволюции других компонентов яда. Механизм формирования такого биомолекулярного разнообразия пока еще не раскрыт. По-видимому, он универсален для пептидных нейротоксинов и ЦП из ядов пауков и основан на существовании многочисленных семейств генов (мультигенных семейств), кодирующих эти пептиды. Биосинтез пептидных компонентов ядов протекает по общей схеме (см. главу VII), для большинства из них характерна «стандартная» организация молекул-предшественников в виде препропептидов [85]. Препроучастки предшественников консервативны, в то время как зрелые цепи отличаются вариабельностью. Явление «концентрирования» мутаций в тех областях генов, которые соответствуют зрелым полипептидам, получило название «ускоренной» эволюции, она характерна для животных с биомолекулярным разнообразием компонентов ядов [86–88].

На основе полученных результатов возникает представление о существовании специальных функций у каждого из компонентов яда. Однако здесь многое еще предстоит выяснить. Следует иметь в виду, что для железистого эпителия ядовитых желез пауков характерен апокриновый (с частичным разрушением секреторных клеток) или даже голокриновый (с полным разрушением клеток) тип секреции, и в составе яда неизбежно присутствуют обычные компоненты клеток, о специальных функциях которых в яде говорить пока сложно [89–92].

Ниже более детально рассмотрены отдельные группы компонентов ядов пауков в соответствии с приведенной в начале этой главы схемой классификации – от более просто устроенных низкомолекулярных веществ к пептидам и, наконец, белкам.

III. НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ КОМПОНЕНТЫ

В ядах пауков обнаружены низкомолекулярные соединения из различных классов неорганических и органических веществ: соли, углеводы, аминокислоты, биогенные амины, АП и др. [1, 2, 29, 93].

В яде странствующего паука *C. salei* концентрации катионов составляют: ~ 10 мМ Na^+ , ~ 200 мМ K^+ , ~ 1 мМ Ca^{2+} , другие соотношения наблюдаются в гемолимфе паука: ~ 200 мМ Na^+ , ~ 10 мМ K^+ ,

~4 мМ Ca^{2+} [6, 94]. Особенно обращает на себя внимание высокая концентрация ионов калия в яде. В такой концентрации они сами по себе могут вызывать парализацию жертвы вследствие т.н. калиевой деполяризации мембран электровозбудимых клеток. Кроме того, выявлен синергизм действия пептидных нейротоксинов яда и солей калия, что, по-видимому, является распространенным явлением, которое отмечено не только для *C. saiei*, но также и для яда скорпиона *Parabuthus transvaalicus* [8, 95]. Предполагают, что механизм синергизма основан на калиевой деполяризации, в ходе которой активируются потенциал-зависимые ионные каналы – мишени нейротоксинов.

В яде многих пауков обнаружены (часто в высоких концентрациях порядка десятков мМ и выше) биогенные амины, такие как серотонин, гистамин, норадреналин и др., а также аминокислоты, например, глутамат, таурин или γ -аминомасляная кислота [8, 74, 93, 94, 96–103]. Большинство из этих соединений известны как нейромедиаторы или нейромодуляторы в нервной системе насекомых, так что их функция в яде очевидна. В некоторых случаях был обнаружен синергизм действия нейротоксинов с этими агентами, влияние которых, вероятно, сходно с эффектом солей калия: происходит активация рецепторов-мишеней нейротоксинов [7, 8] (см. ниже). Известно, что некоторые амины способны вызывать болевой эффект, который, возможно, лежит в основе защитной функции ядов, и, кроме того, увеличивают проницаемость сосудов и усиливают локальный кровоток, способствуя таким образом распространению других токсических компонентов ядов.

В 1994 г. в яде североамериканского воронкового паука *Hololena curta* (семейство Agelenidae) был обнаружен необычный блокатор глутаматных рецепторов, представляющий собой сульфатированный гуанозил-фукопиранозид [104, 105]. Позже с помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) цельных ядов многих видов пауков было показано, что сульфатированные нуклеозиды могут быть их основными низкомолекулярными компонентами [93, 106]. Это моно- или дисульфаты рибонуклеозидов (гуанозина и ксантозина), некоторые из них дополнительно гликозилированы (содержат один или два остатка фукозы). В ядах пауков были также обнаружены нуклеозиды различного типа, функция которых заключается, по-видимому, в потенцировании токсичности полипептидных компонентов [103, 107, 108].

Исследования первой половины 1980-х гг. показали, что яды пауков из семейств «кругопрядов» (Araneidae) и нефиловых (Nephi-

idae), например, *Argiope lobata*, *Nephila clavata*, *Araneus gemma*, посредством блокады глутаматергических синапсов способны нарушать нервно-мышечную передачу у членистоногих [109–111]. В 1986 г. из яда аргиопы дольчатой *A. lobata*, распространенной в Старом Свете, был выделен его основной компонент аргиопин с ММ 636 Да, структура которого была установлена с помощью ЯМР и масс-спектрометрии [112]. В составе аргиопина обнаружено присутствие четырех различных фрагментов: остатков аспарагина и аргинина, 2,4-диоксифенилуксусной кислоты и полиамина (рис. 1).

Аргиопин явился первым представителем обширного класса токсинов из ядов пауков, получивших общее название «ацилполиаминные» или «полиаминные» токсины. В опытах на нервно-мышечном препарате личинки мясной мухи и изолированном спинном мозге лягушки было показано, что аргиопин в концентрациях $\sim 10^{-8}$ – 10^{-6} М блокирует ионные каналы, активированные глутаматом [113–115]. Помимо аргиопина в яде *A. lobata* было обнаружено еще восемь других антагонистов глутаматных рецепторов – аргиопининов и псевдоаргиопининов, обладающих сходным механизмом действия, но имеющих разное сродство к рецепторам (рис. 1). Все идентифицированные токсины избирательно блокировали ионные токи, которые активируются при аппликации на мембрану изолированного нейрона гиппокампа крысы глутамата или агониста одного из типов глутаматных рецепторов каиновой кислоты [116]. Все блокаторы, кроме псевдоаргиопинина III (укороченной формы псевдоаргиопининов), обладали большой структурной гомологией, имели в своем составе остаток аргинина, алифатические полиамины и хромофорные ароматические группировки, модифицированные аспарагином или лизином [117–119]. Примерно в тоже время была установлена структура других блокаторов глутаматных рецепторов из ядов азиатских пауков *Nephila pilipes* (NSTX-3) и *N. clavata* (JSTX-3) [120, 121].

В настоящее время установлено строение более сотни полиаминных токсинов из ядов десятков видов пауков различных систематических групп. Все эти токсины обладают заметной структурной гомологией: в их основе лежит полиаминная цепь, которая имеет первичную, четвертичную амино-, гуанидиновую группу или остаток аргинина на одном конце молекулы и в большинстве случаев – ароматическую группировку (различного типа) – ацильный радикал – на другом конце. Эта группировка соединяется с полиамином либо через а.о., либо непосредственно при помощи амидной связи. При этом в молекулы могут вводиться и другие модификации (рис. 1) [7,

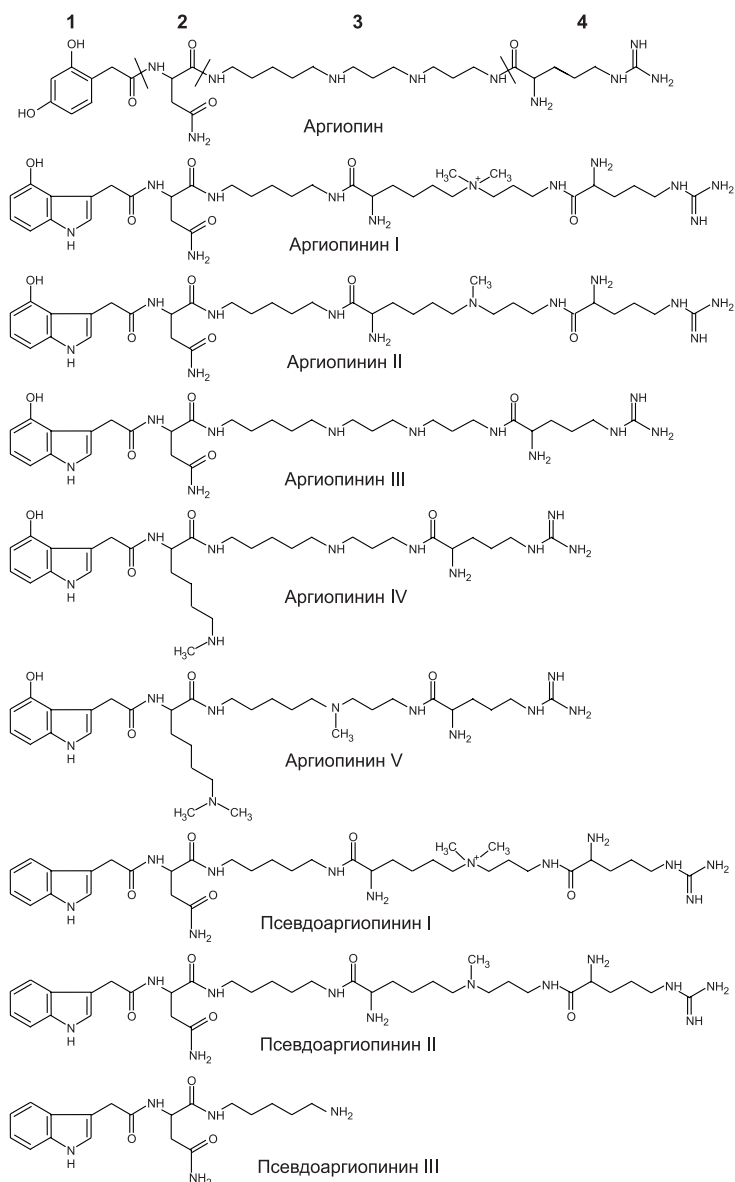


Рис. 1. Комбинаторика ацилполиаминных токсинов в яде паука (на примере *Argiope lobata*).

Пример молекулярного разнообразия компонентов яда пауков (по [117, 118]). Приведены структурные формулы веществ, снизу указаны соответствующие названия. В структуре аргиопина отмечены фрагменты: 1 – ацильный радикал, 2 – промежуточная группа (а.о.), 3 – полиаминная цепь, 4 – концевая группа (остаток аргинина).

18, 35, 68, 122–125]. По своей структуре полиаминная цепь напоминает хорошо известные полиамины – спермин, спермидин, путресцин и кадаверин, которые также были обнаружены в некоторых ядах пауков [101, 126]. Как уже отмечалось, в яде одного паука одновременно может присутствовать сразу несколько различных модификаций АП. Например, в яде *A. aperta* содержатся свыше 30 различных АП (α -агатоксинов), структура которых была установлена масс-спектрометрически [127]. Налицо пример биомолекулярного разнообразия (см. главу II), пауки как будто бы следуют принципам комбинаторной химии. Молекулы токсинов обладают различной эффективностью и специфичностью, а их результирующая смесь активна в отношении широкого круга мишеней. Отметим, что некоторые насекомые синтезируют комбинаторные библиотеки макроциклических полиаминов в защитных целях [128]. Обнаружение филантотоксинов, АП в яде пчелиного волка *Philanthus triangulum*, по-видимому, является свидетельством в пользу конвергентной эволюции компонентов ядов ос и пауков [104, 129].

АП – неконкурентные блокаторы активированных состояний глутаматных рецепторов. Другими словами полиаминные токсины не взаимодействуют с центром связывания агониста, и рецептор должен быть активирован до начала их действия [68, 130]. В связи с этим стоит отметить наличие в ядах пауков-кругопрядов одновременно АП и глутамата. Активация рецепторов глутаматом яда сразу же приводит к эффективному блокированию их полиаминами, таким образом реализуется функциональный синергизм между различными компонентами яда [81]. В ядах воронковых пауков (семейство *Agelenidae*) место глутамата в функциональном отношении занимают μ -агатоксины, опосредованно приводящие к активации глутаматных рецепторов вследствие стимулирования выброса нейромедиатора; эффективность яда (развиваемого паралича) значительно выше при использовании смеси α - и μ -агатоксинов, чем отдельных компонентов [7, 76].

Несмотря на то, что полиаминные токсины продуцируются пауками для обездвиживания преимущественно беспозвоночных жертв посредством блокады их глутаматных рецепторов, они эффективно действуют и на глутаматные, и на ацетилхолиновые рецепторы нервной системы позвоночных. Более того, они влияют на другие ионотропные рецепторы и ионные каналы, причем в большинстве случаев являются поровыми блокаторами, эффективными в микро- и субмикромольных концентрациях (10^{-8} – 10^{-6} М). Возможны и другие механизмы действия [68, 122, 123, 131–136]. Сравнение эффективности природных и синтетических аналогов позволило установить

функциональную значимость различных участков молекул АП: длины и степени модификации полиаминной цепи, величины и типа ацильного радикала, а также линкерного участка. В некоторых исследованиях удалось добиться повышения селективности для различных типов рецепторов (до $\sim 10^3$ раз) и эффективности (K_d комплекса с рецептором $\sim 10^{-9}$ М) полиаминных токсинов посредством направленной модификации их молекул и химическим синтезом соответствующих аналогов [18, 116, 137, 138]. Полиаминные токсины – незаменимые инструменты в исследованиях глутаматных рецепторов. Например, JSTX-3 используется для идентификации субъединиц глутаматных рецепторов (за высокую чувствительность к действию токсина отвечает переменный а.о.) [139]. С привлечением методов компьютерного моделирования получена важная информация о структуре поровой области и принципах функционирования рецепторов разного типа, проведен дизайн селективных лигандов [139–143].

Функция многих известных компонентов ядов пауков пока не ясна. Так, в яде некоторых пауков обнаружен цитрат [100, 144]. Функция этого соединения в ядах пчел и змей состоит в ингибировании Ca^{2+} -зависимых фосфолипаз, т.е. в защите от собственных токсинов. При попадании яда в организм агрессора или жертвы происходит разбавление смеси и снятие ингибирующего эффекта [145]. Учитывая развитие аналитических методов, следует ожидать, что химический ассортимент известных низкомолекулярных веществ из ядов пауков вскоре будет существенно расширен.

IV. ЛИНЕЙНЫЕ ПЕПТИДЫ

Линейные, т.е. не содержащие дисульфидных связей пептиды, довольно часто встречаются в ядах пауков [18, 28, 29, 38]. В основном они проявляют цитолитическое действие, не характерное для дисульфид-содержащих пептидных компонентов яда. В связи с этим линейные пептиды удобно выделять в особую группу компонентов ядов пауков. Однако по мере развития исследований обособление данной группы, вероятно, будет представляться все более условным. Так, из ядов некоторых пауков были выделены короткие линейные кинин-подобные, брадикинин-потенцирующие пептиды, а также ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента, что характерно для ядов других животных [146–149]. Эти соединения, вмешиваясь в физиологический статус жертвы, по-видимому, вносят вклад в общую токсичность ядов.

Некротическая активность многих ядов пауков была известна давно [1]. По современным представлениям она может быть обусловлена присутствием компонентов двух типов – линейных пептидов и крупных белков с фосфолипазной активностью [33, 38]. Прообразами обеих групп веществ являются ставшие «классическими» основные компоненты яда медоносной пчелы *Apis mellifera* – ЦП мелиттин и белок фосфолипаза A₂, присутствие которых обуславливает высокую и неспецифическую цитотоксичность пчелиного яда [60, 67, 150]. Что касается пауков, то в 1998 г. был проведен скрининг цитолитической активности для ядов 26 видов [151], тогда же была впервые установлена аминокислотная последовательность для двух ЦП из яда североамериканского тарантула *Hogna carolinensis* (*Lycosa carolinensis*; семейство пауки-«волки», Lycosidae) [69]. Благодаря последующим работам в этой области, сформировалось представление о ЦП как о важном компоненте ядов членистоногих [38, 152].

В настоящее время из ядов пяти видов пауков (семейства Stenidae, Lycosidae, пауки-«рыси» Oxyopidae, Zodariidae) выделено и охарактеризовано около 30 ЦП, объединяемых в 12 групп (см. табл. 5; аминокислотные последовательности приведены в секции Swiss-Prot базы данных UniProt [153]) [62, 63, 69–72, 154]. Помимо линейности, они характеризуются следующими особенностями: это короткие (содержат <50 а.о., за исключением цитоинсектотоксинов, о которых речь пойдет ниже) катионные (сравнительно большой положительный заряд молекул при нейтральном pH, pI > 10) и амфифильные (см. ниже) полипептиды, склонные к формированию α -спиралей и обладающие сродством к липидным бислоям [38]. Все упомянутые свойства присущи также множеству пептидов, выделенных из самых различных организмов и выполняющих функцию защиты от патогенов. Они формируют самую большую группу антимикробных пептидов (АМП) [155], т.н. α -спиральных АМП: в водной среде эти пептиды неупорядочены, а при контакте с мембранами приобретают α -спиральную конформацию [156]. Мишенью действия ЦП служит цитоплазматическая мембрана, их положительный заряд обеспечивает электростатическое связывание с ее поверхностью, амфипатичность позволяет пептидам встраиваться в бислой – нарушение его целостности и является причиной гибели клеток [157–159].

Свойство амфифильности (амфипатичности) выражается в пространственном разделении гидрофобных и гидрофильных (в том числе заряженных) а.о., формирующих скопления (кластеры, пэтки) на поверхности молекул. Амфипатичность может проявляться на

Таблица 5.
Цитолитические пептиды из яда пауков

Вид пауков	Название пептида ¹	Аминокислотная последовательность ²	заряд (при pH 7)	число а.о.
<i>Hogna carolinensis</i>	ликотоксин I, P61507	IWLTALKFLGKHAAKHLLAKQQLSKL-NH ₂	+6	25
	ликотоксин II, P61508	KIKWFKTMKSIKFTIAKEMKMKHLLGGE	+6	27
<i>Lycosa singoriensis</i>	ликоцитин 3, P0C2U8	KIKWFKTMKSLAKFLAKEMKMKHLLGGE	+6	26
	ликоцитин 1, P0C2U6	GKLAFLAKMKEIAAQTL-NH ₂	+3	18
<i>Oxyopes takobius</i>	оксиопинин 1, P83247	FRGLAKLLKIGLKS FARVLKKVLPKAAKAKALAKSMADENAIRQQNQ	+10	48
	оксиопинин 2a, P83248	GKFSVFGKILRSIAKVFVGKVRKQFKTASDLDKNQ	+8	37
<i>Cupiennius salei</i>	купиеннин 1a, P83619	GFGALFKFLAKKVAKTVAKQAAKQGAKYVVNKQME-NH ₂	+8	35
	лагарцин 1, Q1ELT9	SMWSGMWRRLKLLRNALKKLKGGE	+9	25
<i>Lachesana tarabaevi</i>	лагарцин 2a, Q1ELU1	GLFGKLIKKFGRKAI SYAVKKARGKH	+9	26
	лагарцин 3a, Q1ELU3	SWKSMACKLKE YMEKLLQRA-NH ₂	+6	20
	лагарцин 4a, Q1ELU5	GLKDKFKSMGEKLLQYIQTWKAFF-NH ₂	+6	24
	лагарцин 5, Q1ELU9	GFFGKMKYFKKFGASFRRRFFANLKKRL-NH ₂	+10	28
	цитоинсектоксин 1a, P85253	GFFGNTWKIKGKADKIMLKKAVKIMVKKEGISKEEAQAKVDAMSKQIRLYLLKYGGKALQKASEKL	+14	69
<i>Grammostola rosea</i>	GsMTx-4, Q7YT39	GCLDFWVKCNPNDDKCCRPKLC ^u SKLFLKLCNFSF-NH ₂	+5	34

¹Приведены коды из базы данных UniProt [153].

²Окраска а.о.: гидрофобные – черным, положительно заряженные – синим, отрицательно заряженные – красным, гидрофильные незаряженные – зеленым, остатки глицина – серым. Остатки полуцистина выделены подчеркиванием. C-Концевое амидирование отмечено как –NH₂.

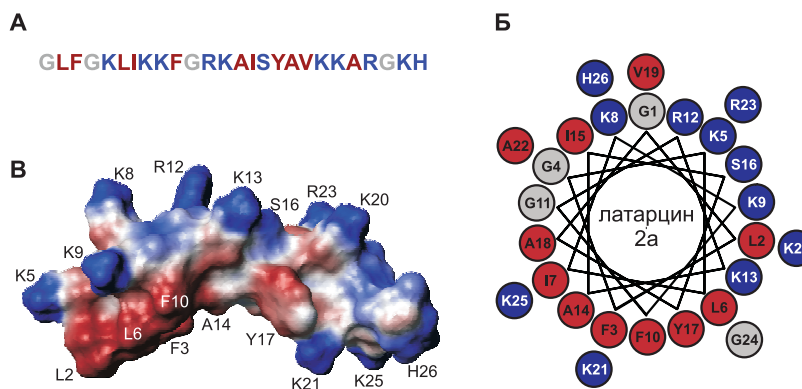


Рис. 2. Цитолитический пептид латарцин 2а из яда паука *Lachesana tarabaevi*.

А – аминокислотная последовательность (код в базе данных UniProt Q1ELU1 [153]). Б – проекция «спирального колеса». Гидрофобные остатки обозначены красным, гидрофильные – синим, остатки глицина – серым. В – пространственная структура пептида в комплексе с мицеллами детергента (код в базе данных PDB 2G9P [162]). Воображаемая поверхность молекулы пептида раскрашена в соответствии с гидрофобным потенциалом (гидрофобные области красные, гидрофильные – синие) [166, 167] с использованием программы MOLMOL (<http://hugin.ethz.ch/wuthrich/software/molmol/>).

уровне первичной структуры, например, у мелиттина положительно заряженные а.о. группируются в С-концевой области [160]. Для большинства ЦП из ядов пауков и α -спиральных АМП амфипатичность проявляется на уровне вторичной структуры и не сводится к какому-то одному определенному распределению а.о. вдоль аминокислотной последовательности. Наглядно амфипатические α -спирали удобно представлять с использованием проекций на плоскость, например, т.н. «спирального колеса» (проекция Шиффера–Эдмундсона) (рис. 2) [161]. В некоторых случаях амфипатичность становится очевидной при рассмотрении пространственной структуры, например, это относится к купиеннинам [72]. Сегодня пространственная структура известна для трех ЦП из ядов пауков (исследовались методом ЯМР, результаты представлены в базе данных PDB [162]): купиеннина 1а (из яда *C. salei*) в водном трифторэтаноле, имитирующем мембранное окружение (код в базе данных PDB 2K38) [163], и двух латарцинов – 1 и 2а (из яда *L. tarabaevi*) в комплексе с мицеллами додецилсульфата натрия (2PCO, 2G9P) [164, 165]. Все три структуры сходны: пептиды формируют амфипатические α -спирали. Вследствие свойства амфипатичности ЦП характеризуются своеобразным внутримолекулярным градиентом гидрофобного потенциала (рис. 2) [166, 167] и могут эффективно

встраиваться в мембраны. При этом боковые цепи гидрофильных а.о. ориентируются в водную фазу (и/или мембранный «интерфейс», где взаимодействуют с липидными «головками»), в то время как боковые цепи гидрофобных а.о. погружаются в неполярную фазу липидных «хвостов».

ЦП из ядов пауков проявляют активность в отношении широкого спектра клеток-мишеней про- и эукариотического происхождения в микромолярном диапазоне концентраций. В сравнении с нейротоксинами они представляются менее специфичными и эффективными. Большая часть этих веществ характеризуется низкой селективностью и, соответственно, рецептор-независимым механизмом действия. Не будет преувеличением сказать, что ЦП из ядов пауков и других членистоногих – типичные мембранолитики, тем не менее, эффективность их действия зависит от липидного состава мембран и мембранного потенциала [38, 62, 63, 67, 71, 152, 154, 156–158, 168–171]. Для объяснения увеличения проницаемости мембран клеток-мишеней под действием ЦП предложено несколько моделей. Чаще в литературе встречаются три из них. Согласно модели «доска-бочка» молекулы ЦП образуют олигомеры, пронизывающие мембрану с формированием канала или поры. Экспериментальное подтверждение этой модели получено для пептидного антибиотика (пептаибола) аламетицина [172]. Другая модель предполагает формирование «ковра» из множества встроенных молекул пептида на мембране, разрушение которой происходит после достижения пороговой концентрации. Эта модель была предложена для АМП из кожи амфибий (дермасептинов) и гемолимфы насекомых (цекропинов) [173–175] и предполагается для многих латарцинов [164, 165, 168]. Экспериментальное обоснование для наибольшего числа ЦП (например, для магайнина из кожи лягушки и мелиттина) получила модель «тороидальных» пор, формируемых как молекулами пептида, так и липидами мембраны [176, 177]. Предполагают, что большинство ЦП из ядов пауков действуют именно так [163, 165, 168, 170, 171]. Необходимо отметить возможность действия пептида одновременно по нескольким механизмам, а также отсутствие реальных четких границ между описанными моделями; делаются попытки объединения всех моделей в одну [159, 168, 178]. Кроме того, на наш взгляд, в биологическом смысле отсутствует принципиальность значения деталей механизма действия ЦП, а важен лишь конечный итог – реализация токсической функции.

Среди дополнительных характеристик α -спиральных ЦП из ядов пауков стоит отметить следующие. (1) Явное преобладание остатков лизина над остатками аргинина. Причины такого предпочтения

до конца не ясны; более того, чаще замена одних положительно заряженных а.о. другими не сказывается на функциональных свойствах ЦП [179]. Остатки аргинина входят в мотивы процессинга предшественников пептидных компонентов яда, и их элиминирование из последовательностей зрелых пептидов может быть связано с обеспечением корректности созревания (см. главу VII). (2) Частое наличие посттрансляционной модификации – С-концевого амидирования. Такая модификация обусловлена присутствием дополнительного С-концевого остатка глицина в молекулах-предшественниках (см. главу VII) [180]. (3) Достаточно часто N-концевым а.о. выступает глицин или серин, что, по-видимому, связано с особенностями ограниченного протеолиза пропептидов, а именно со спецификой процессирующих ферментов. (4) Несмотря на общее предпочтение в пользу а.о. с высоким потенциалом формирования α -спиральной конформации, в середине последовательностей ЦП часто встречаются остатки глицина и/или пролина. В результате пептиды характеризуются структурой типа спираль–петля–спираль. Появление локальных областей с неупорядоченной структурой или с достаточно выраженной конформационной лабильностью влияет на функциональные особенности молекул, их специфичность в отношении мембран различного типа [163–165, 171, 181, 182].

Для сравнения в табл. 5 приводится последовательность дисульфид-содержащего пептида GsMTx-4 (код в базе данных UniProt Q7YT39 [153]) из яда чилийского розового птицеда *Grammostola rosea* (*Grammostola spatulata*; семейство Theraphosidae). Этот пептид является ингибитором механочувствительных рецепторов млекопитающих, но также проявляет и цитолитическое действие [183, 184]. По своей структуре он является типичным нейротоксином из яда паука и относится к классу молекул, формирующих в пространстве т.н. «цистиновый узел» (см. главу V) [185]. К этому же классу относится большое число АМП из растений, а также гемолимфы членистоногих [186, 187]. Таким образом, проявляется эволюционный параллелизм структуры молекул ЦП. Обнаружено, что классический блокатор калиевых каналов харибдотоксин из яда скорпиона *Leiurus quinquestriatus hebraeus* тоже обладает антимикробными свойствами и по пространственной структуре (мотив «цистеин-стабилизированных α -спирали– β -слоя», CS $\alpha\beta$, от англ. cysteine-stabilized α -helix– β -sheet) похож на АМП из других источников [188, 189]. Существование молекул, проявляющих одновременно нейро- и цитотоксическую активности можно объяснить (а) случайным возникновением менее специфичной и малозначимой цитолитической активности за счет

выполнения необходимых структурных требований амфифильности, наличия заряда и т.п. [190]; (б) направленным отбором таких молекул, являющихся либо своеобразной точкой дивергенции нейротоксинов и ЦП, либо удачно совмещающих обе необходимые функции.

В яде *L. tarabaevi*, помимо упомянутых коротких лагарцинов, были обнаружены длинные линейные цитоинсектотоксины, обладающие одинаково выраженными антимикробной, цитолитической и инсектицидной активностями [63, 154]. Эти пептиды вдвое превосходят «средние» ЦП как по длине, так и заряду (табл. 5), однако по другим характеристикам относятся к α -спиральным АМП. В настоящее время они, пожалуй, самые длинные из известных пептидов этого класса. С «обычными» пептидными токсинами их сближает биологическая активность, а отсутствие в их структуре дисульфидных связей позволило выделить цитоинсектотоксины в самостоятельную группу компонентов ядов пауков, а также ЦП и АМП. Цитоинсектотоксины могут рассматриваться как составленные из двух коротких пептидов (длина около 30 а.о.), соединенных линкером, напоминающим мотив процессинга предшественников из ядовитых желез пауков (см. главу VII). Предполагается, что эти соединения эволюционно возникли из «двойных» предшественников в результате мутации ключевого остатка аргинина в сайте процессинга и, таким образом, представляют собой своеобразные «модульные» молекулы типа ЦП–ЦП. Мутация была закреплена, поскольку имела позитивный эффект: цитоинсектотоксины, в отличие от коротких ЦП, обладали высокой инсектицидной активностью. Известен еще один пример модульных пептидных токсинов: в структуре некоторых полипептидов из ядов скорпионов объединены модули линейного ЦП и $CS\alpha\beta$ – тип ЦП– $CS\alpha\beta$ [191, 192]. На наш взгляд, разнообразие модульных токсинов может быть шире, их возникновение согласуется с общим эволюционным вектором «от простого к сложному».

Активная функция АМП как эффекторных молекул врожденного иммунитета у растений и животных является общепризнанной [193–195]. Бактерии и грибы также продуцируют ЦП с целью вытеснения конкурентов из экологических ниш [196]. Предложен ряд возможных функций ЦП из ядов пауков [38]. (1) Прямой токсический эффект чаще всего рассматривается как главная функция ЦП в ядах [63, 67, 69]. Однако необходимо отметить большие различия как в цито-, так и общей токсичности разных ЦП, наличие некоторая специфичность действия. Кроме того, данная функция очевидна, только если соответствующие пептиды являются мажорным компонентом яда, в противном случае их вклад

в токсичность незначителен [62, 152]. (2) Синергизм действия с нейротоксинами. Данный эффект экспериментально установлен для оксиопининов и купиеннинов [8, 71]. Молекулярные основы синергизма не ясны; предполагается, что ЦП служат своеобразным «проводником», «фактором распространения» для нейротоксинов, обладая цитолитическими свойствами, «расчищают» путь к нейронам через защитные клеточные барьеры. (3) Прямой антимикробный эффект. Многие членистоногие живут в крупных скоплениях или колониях, где необходимо максимально снизить риск эпидемий. Возможно, что яд с ЦП используется как антисептик [66, 197]. Кроме того, концентрация ЦП в ужаленной жертве, как правило, достаточна для уничтожения всех микроорганизмов, и эти соединения могут использоваться в качестве консервантов. Наконец, функция ЦП может состоять и в непосредственной защите ядовитых желез от инфекции [191, 198, 199]. По неясным для нас причинам, авторами работ по цитолитическим компонентам ядов не рассматривается их функция во внешнем пищеварении, характерном для пауков. На наш взгляд, очевидна способность ЦП облегчать переваривание пищи за счет разрушения клеточных и тканевых структур организма жертвы, и такая функция ЦП является, по-видимому, одной из главных.

V. ДИСУЛЬФИД-СОДЕРЖАЩИЕ ПЕПТИДЫ

В настоящее время из ядов пауков около 60 видов из 20 семейств охарактеризовано примерно 500 пептидов (аминокислотные последовательности представлены в секции Swiss-Prot базы данных UniProt [153]) с $M_m < 10$ кДа, большая часть которых содержат дисульфидные связи и проявляют нейротоксические свойства. Однако это лишь малая доля реального природного разнообразия. Пептидомные и генетические исследования указывают на одновременное присутствие в одном яде до нескольких сотен и более пептидов, так что с учетом поразительного видового многообразия пауков [200, 201] можно считать, что исследователи имеют здесь дело с громадной природной библиотекой, насчитывающей порядка десятков миллионов или более молекул [3, 4, 31, 32, 45, 46, 48, 202, 203]. Нейротоксины эффективно действуют на соответствующие рецепторы, как правило, уже в наномолярных концентрациях, происходит формирование комплекса с множеством контактов (K_d комплекса токсина с рецептором $\sim 10^{-9}$ М), т.е. реализуется акт специфичного распознавания мишени. В сравнении с неселективными веществами, например, ЦП, нейротоксины оказывают токсический эффект в существенно меньших (по крайней

мере на порядок) дозах. При этом значение т.н. средней летальной дозы (LD_{50}), вызывающей 50% смертность, зависит от организма-мишени и способа введения токсина (может варьировать в широких пределах от долей мкг/кг до десятков мг/кг и вплоть до отсутствия значимой токсичности), что связано прежде всего именно с селективностью в отношении определенных рецепторов.

Помимо пептидов из ядов пауков, хорошо охарактеризованы многие семейства полипептидных токсинов, действующих на различные мишени и выделенных из животных различного систематического положения, например, змей, скорпионов, моллюсков конусов и морских анемонов; число известных веществ насчитывает не одну тысячу. Для успешного ориентирования в этом многообразии необходима адекватная классификация и номенклатура токсинов. Тенденция последнего времени в наименовании токсинов с использованием в названиях греческих символов и имен животных-продуцентов неоспорима. Детально проработана номенклатура токсинов конусов, которая подразумевает, что греческая буква перед названием полипептида указывает на основную мишень его действия [83]. Однако этот принцип не всегда соответствует принятым нормам в номенклатуре токсинов из других животных. Кроме того, разделение только по основным мишеням является недостаточным из-за большого количества токсинов с неустановленным фармакологическим действием, поэтому дополнительно для их классификации используются другие критерии. Например, те же конотоксины с учетом распределения остатков цистеина в аминокислотной последовательности подразделяются на несколько суперсемейств, внутри каждого из которых сформированы отдельные группы по механизму действия [83, 204]. Для токсинов скорпионов, действующих на калиевые каналы, создана классификация, основанная на гомологии первичной структуры и расположении структурно важных а.о. [205, 206]. Для пептидных токсинов пауков предложен принцип классификации по типу мотивов первичной структуры, который базируется на анализе аминокислотных последовательностей с использованием специального алгоритма и не учитывает фармакологические свойства молекул [45]. Следующим шагом стала недавно предложенная «глобальная» классификация животных токсинов, в которой совмещены показатели их фармакологических свойств и данные о систематическом положении животных-продуцентов [207]. Отметим наиболее часто встречающиеся символы в названиях токсинов пауков: α – мишенью служат хемовозбудимые ионотропные рецепторы постсинаптической мембраны (никотиновые

ацетилхолиновые и глутаматные), κ – K^+ каналы, μ – Na^+ каналы (в новейшей номенклатуре символ μ используется только для поровых блокаторов, для модуляторов этих каналов используется символ δ), ω – Ca^{2+} каналы.

В отличие от конотоксинов [208], пептидные токсины пауков редко содержат модифицированные а.о. Распространенные пост-трансляционные модификации этих молекул включают C-концевое амидирование и отщепление C-концевых положительно заряженных а.о. – «стандартные» превращения в биосинтезе секретируемых полипептидов у эукариот (см. главу VII). Единичные исключения составляют PLTX-II из яда *Plectreurys tristis* (семейство Plectreuridae; P34079) и ω -агатоксин IVB из яда *A. aperta* (P37045). В первом случае C-концевой а.о. модифицирован пальмитиновой кислотой [209], во втором – изменена хиральность одного а.о., что приводит к значительному повышению активности (на один-два порядка) и стабильности токсина [210, 211]. ω -Агатоксины IA и IB (P15969, P15970) представляют собой двухцепочечные полипептиды (Мм ~7,5 кДа), цепи которых удерживаются дисульфидной связью. Обе цепи токсинов кодируются одним геном, и их разделение является результатом расщепления пропептида в соответствии с характерными мотивами ограниченного протеолиза (см. главу VII) [85, 212]. Еще один пример двухцепочечного пептида – CSTX-13 (Мм ~7,5 кДа; P83919), т.н. нейротоксический энхансер из яда *C. salei* [80], по-видимому, синтезирующийся аналогичным образом.

Пептидные токсины пауков, независимо от их биологической активности, характеризуются целым рядом черт аминокислотной последовательности, определяющих укладку полипептидной цепи в пространстве. 3D-структура этих молекул, ввиду их малого размера, обычно исследуется методом ЯМР. В настоящее время можно с уверенностью говорить о трех типах укладки («фолдах», от англ. fold), характерных для пространственной структуры дисульфид-содержащих пептидов из ядов пауков (представлены в базе данных PDB [162]). Все три типа укладки не являются уникальными для пауков, а чрезвычайно широко распространены в природе. Разнообразие функций пептидов с одинаковым типом пространственного строения обусловило пристальный интерес ученых к этим укладкам, выступающим в роли своеобразных структурных «каркасов» для создания соединений с заданными свойствами. Вслед за иммуноглобулиновыми доменами типы укладок, представленные ниже, являются излюбленными объектами структурной биологии, рационального дизайна и структурно-функциональных исследований биологически активных соединений [213, 214].

Для подавляющего большинства известных пептидных токсинов пауков характерна укладка полипептидной цепи, описываемая структурным мотивом т.н. «цистинового узла» (в англоязычной литературе inhibitor cystine knot, ИСК) (табл. 3, 4). Этот же мотив встречается у множества пептидов с разнообразными функциями, выделенными из самых различных источников: животных, растений, грибов, вирусов: $C^1 X_{2-7} C^2 X_{3-11} C^3 X_{0-7} C^4 X_{1-17} C^5 X_{1-19} C^6$, где X – любой а.о. Расположение дисульфидных связей для всех молекул этого типа следующее: C^1-C^4 , C^2-C^5 , C^3-C^6 . Пространственная структура пептидов с мотивом ИСК характеризуется наличием β -шпильки и своеобразного «узла» (отсюда их название): третья по счету дисульфидная связь (C^3-C^6) пронизывает кольцо, образованное двумя другими дисульфидами и атомами основной цепи, их соединяющими. Полипептиды с укладкой ИСК часто также именуется как ноттины (от англ. knot – узел); в настоящее время известно свыше тысячи ноттинов с различной биологической функцией: ингибиторы протеаз, АМП, инсектицидные и антигельминтные пептиды, нейротоксины, гуморальные регуляторы и т.д. [39, 41–43, 186, 187]. Стоит отметить, что для некоторых молекул выполняются условия мотива первичной структуры и характерен тот же тип расположения дисульфидов, однако структура узла в пространстве не образуется, поэтому эти молекулы не относятся к классу ИСК [215]. Таким образом, мотивы первичной структуры и даже расположение дисульфидных связей не всегда однозначно определяют укладку (фолд) молекулы.

В «канонической» структуре токсинов пауков ноттинового типа, содержащих шесть остатков полуцистина, можно выделить три основных фрагмента (рис. 3). N-Концевой участок длиной порядка 8–10 а.о. (до второго остатка полуцистина, зеленая область на рис. 3), центральный фрагмент, наиболее богатый остатками полуцистина и содержащий характерный «сдвоенный» мотив СС (желтый цвет на рис. 3), и наконец, C-концевой фрагмент после пятого остатка полуцистина, отличающийся наибольшей вариабельностью как по размеру, так и по аминокислотному составу (синий цвет на рис. 3). Отмечена строгая закономерность распределения остатков цистеина в N-концевой и центральной частях аминокислотной последовательности токсинов, что привело к формулированию для них специального мотива первичной структуры. Для подавляющего большинства токсинов расстояние между первым и вторым остатком цистеина соответствует шести а.о., а третий и четвертый остатки цистеина, как правило, занимают соседние позиции. Эти наблюдения позволили определить т.н. основной структурный мотив (principal structural

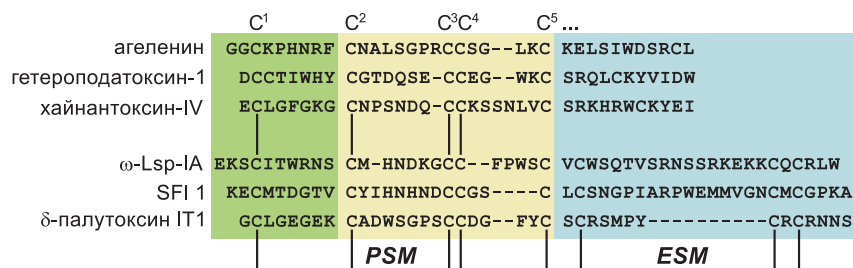


Рис. 3. Аминокислотные последовательности пептидных токсинов пауков с указанием мотивов PSM и ESM.

В качестве примеров приведены агеленин из *Allagelena opulenta* (код в базе данных UniProt P31328 [153]), гетероподатоксин-1 из *Heteropoda venatoria* (P58425), хайнантоксин-IV из *Haplopelma hainanum* (P83471), ω-Lsp-IA из *Geolycosa* sp. (P85079), SFI 1 из *Segestria florentina* (P61095), δ-палутоксин IT1 из *Paracoelotes luctuosus* (P83256). N-Концевой фрагмент молекул расположен на зеленом фоне, центральный – на желтом, C-концевой – на синем. Разрывы внесены для оптимизации сравнения последовательностей. Сверху приведена нумерация первых пяти остатков цистеина.

motif, PSM): C¹ X₆ C².....C³ C⁴, где X – любой а.о. С практической точки зрения наличие в какой-либо исследуемой структуре пептида из яда паука мотива PSM, по-видимому, является достаточным условием, чтобы предположить нейротоксическую функцию. Это обычно актуально, когда аминокислотная последовательность выведена из нуклеотидной. Анализ последовательностей, содержащих более шести остатков цистеина, выявил еще одну закономерность: у более 70% проанализированных структур пятый и шестой, а также седьмой и восьмой остатки цистеина располагаются с интервалом в один а.о. (см., например, табл. 4). В результате предложен дополнительный структурный мотив (extra structural motif, ESM): C⁵ X C⁶.....C⁷ X C⁸, где X – любой а.о. Присутствие в исследуемой структуре мотива ESM без PSM не указывает достоверно на нейротоксическую функцию пептида. Примеры выявленных у токсинов пауков мотивов PSM и ESM приведены на рис. 3; обнаружено также несколько более редких разновидностей этих мотивов [45].

Распространенность укладки типа ИСК у пептидных нейротоксинов пауков подтверждена при исследовании более чем 30 пространственных структур, однако при сохранении общего фолда реализуется высокое разнообразие (примеры представлены на рис. 4 и 5). Для множества токсинов этот тип укладки подразумевается, исходя из расположения остатков цистеина в первичной структуре и (когда

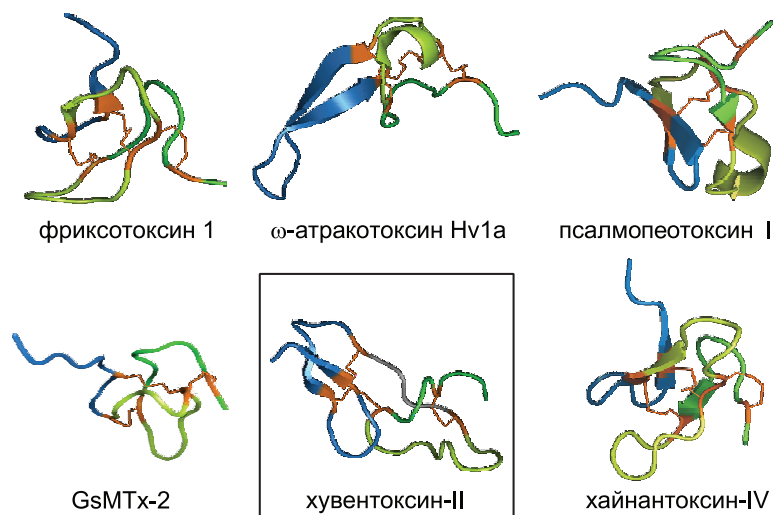


Рис. 4. Модели пространственной структуры пептидных токсинов из ядов пауков с шестью остатками цистеина.

Ленточные модели построены в программе PyMOL (<http://www.pymol.org/>). В качестве примеров приведены фриксотоксин 1 из *Paraphysa scrofa* (код в базе данных PDB 1V7F [162]), GsMTx-2 из *Grammostola rosea* (1LUP), ω-атракотоксин Hv1a из *Hadronyche versuta* (1AXH), псалмопептооксин I из *Psalmopoeus cambridgei* (1X5V), хайнантоксин-IV из *Haplopelma hainanum* (1NIY) (мотив ICK) и хувентоксин-II из *Haplopelma schmidtii* (1I25; мотив DDH, выделен рамкой). N-Концевой фрагмент полипептидной цепи выделен зеленым цветом, центральная часть – желтым, C-концевой фрагмент – синим (см. рис. 3). Остатки цистеина и дисульфидные связи обозначены оранжевым.

известно) общей схемы образования дисульфидных связей. Пептиды формируют в пространстве плотно упакованные клубки с чрезвычайно стабильной структурой. В терминах мотивов PSM и ESM, к центральному кору (желтый цвет на рис. 4, 5) фиксируются как N-концевая (зеленый цвет на рис. 4, 5), так и C-концевая (синий цвет на рис. 4, 5) области молекулы. Преобладающими элементами вторичной структуры при этом являются β-тяжи и β-изгибы, α-спиральная конформация встречается редко. Размер β-шпильки зависит от расстояния между пятым и шестым остатками цистеина «канонического» цистинового узла, а в структуре многих токсинов присутствует дополнительный третий тяж антипараллельной β-структуры, образованный N-концевой областью молекул.

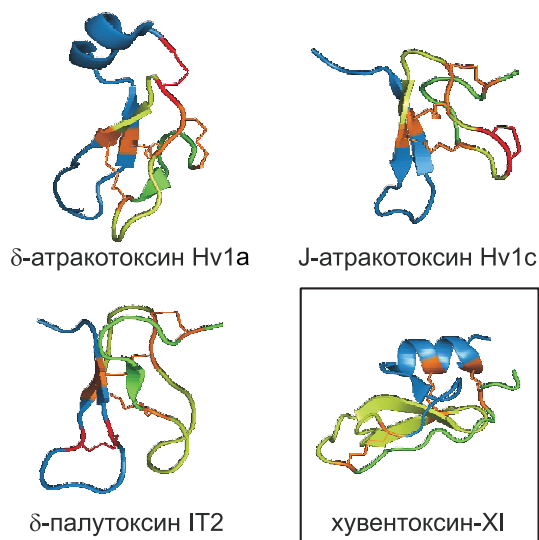


Рис. 5. Модели пространственной структуры пептидных токсинов из ядов пауков с восемью остатками цистеина.

Ленточные модели построены в программе РuMOL. В качестве примеров приведены δ -атракотоксин Hv1a (1VTX) и J-атракотоксин Hv1c (1DL0) из *Hadronyche versuta*, δ -палутоксин IT2 из *Paracoelotes luctuosus* (1V91) (мотив ICK) и хувентоксин-XI из *Haplopelma schmidtii* (2JOT; мотив Кунитца, выделен рамкой). Окраска как на рис. 4. Остатки цистеина и дисульфидные связи, не относящиеся к мотиву ICK у первых трех пептидов, выделены красным цветом.

В молекулах с укладкой цистинового узла могут встречаться более шести остатков полуцистина, при этом дисульфидные связи располагаются так, что мотив ICK не нарушается (см. рис. 5). Более того, известно приблизительно одинаковое количество токсинов пауков с тремя и четырьмя дисульфидными связями. Для последних, как правило, характерно наличие мотива ESM (см. рис. 3) и реализуется такая схема расположения S-S-мостов: C¹-C⁴, C²-C⁵, C³-C⁸, C⁶-C⁷; четвертая «дополнительная» дисульфидная связь (красный цвет на рис. 5) введена в структуру β -шпильки, которая в этом случае обычно удлинена (в качестве примера на рис. 5 приводится δ -палутоксин IT2, 1V91). Дополнительным структурным элементом δ -атракотоксинов из яда австралийских воронковых пауков (роды *Atrax* и *Hadronyche*, семейство Hexathelidae) служит фиксирование C-концевой области молекулы четвертой дисульфидной связью, при этом в первичной структуре присутствует характерный триплет

ССС [216, 217]. Для инсектотоксинов из ядов этих же пауков, получивших название к- или J-атракотоксинов (J-АСТХs), была выявлена редкая вицинальная дисульфидная связь между остатками цистеина в соседних положениях. Эта связь не принимает участия в стабилизации укладки полипептидной цепи, однако является критически важной для биологической активности, по-видимому, участвуя в непосредственном контакте с рецептором [218].

При анализе пространственной структуры J-АСТХs было обнаружено, что наибольшее сходство они имеют с пептидами, не содержащими цистиновый узел, а характеризующимися структурным мотивом «дисульфид-направленной β -шпильки» (от англ. disulfide-directed β -hairpin, DDH): $C^1 X_{5-19} C^2 X_2 G/P X_2 C^3 X_{6-19} C^4$, где X – любой а.о.; расположение дисульфидных связей: C^1-C^3 , C^2-C^4 [218]. Такой мотив подразумевает формирование в пространстве β -шпилек, стабилизированных двумя инвариантными дисульфидными связями; наличие при этом дополнительных элементов вторичной структуры и дисульфидов не ограничивается. Предполагается, что мотив DDH эволюционно более ранний, а укладка типа ICK сформировалась на его основе [219, 220]. Мотив DDH характерен, например, для хувентоксина-II из яда китайского паука-птицееда *Haplopelma schmidti* (syn. *Haplopelma huwenum*, *Ornithoctonus huwena*, *Selenocosmia huwena*, семейство Theraphosidae; 1125) с расположением дисульфидов C^1-C^3 , C^2-C^5 , C^4-C^6 (см. рис. 4), возможен и для ряда других пептидов [219].

В яде паука *H. schmidti* был также обнаружен хувентоксин-XI (2JOT), пространственная структура которого описывается мотивом Кунитца (Kunitz) [221]. Данный мотив широко распространен в природе и характерен для ряда ингибиторов протеаз (например, наиболее известного бычьего панкреатического ингибитора трипсина или апротинина), блокаторов K^+ каналов (из морских анемонов и змей) и других пептидов [222–226]. Расположение дисульфидных связей у этих молекул следующее: C^1-C^6 , C^2-C^4 , C^3-C^5 , а пространственная укладка включает короткую N-концевую 3_{10} -спираль, C-концевую α -спираль и три тяжа антипараллельной β -структуры (см. рис. 5).

Заметим, что в аминокислотной последовательности некоторых пептидных компонентов ядов пауков отсутствуют характерные мотивы, соответствующие перечисленным выше фолдам. Таким образом, разнообразие укладок этих молекул может быть существенно шире представленного здесь.

Дисульфид-содержащие пептиды из ядов пауков отличаются высоким многообразием функциональных особенностей (табл. 6). Многие, как например, одни из первых изученных пептидных токсинов

Таблица 6.
Некоторые мишени дисульфид-содержащих токсинов пауков

Мишень	Пример токсина ¹	Механизм действия
K ⁺ каналы	хувентоксин-XI, P68425	поровый блокатор
	ханатоксин 1, P56852	блокатор-модулятор активации
Na ⁺ каналы	хувентоксин-IV, P83303	поровый блокатор
	протоксин I, P83480	блокатор-модулятор активации
	μ-агатоксин I, P11057	модулятор активации
	робустоксин, P01478	ингибитор инактивации
Ca ²⁺ каналы	ω-агатоксин IIIA, P33034	поровый блокатор
	ω-граммотоксин SIA, P60590	блокатор-модулятор активации
H ⁺ рецепторы	псалмотоксин 1, P60514	блокатор
механорецепторы	GsMTx-4, Q7YT39	блокатор
терморецепторы	ваниллотоксин 3, P0C246	активатор

¹Приведены коды из базы данных UniProt [153].

пауков – ω-агатоксины из яда *A. aperta*, действующие на кальциевые каналы (1990 г.), и ханатоксины из яда *G. rosea*, действующие на калиевые каналы (1995 г.), – стали сегодня незаменимыми инструментами исследования их мишеней [7, 21, 24, 79, 227, 228]. С точки зрения биологии главные мишени токсинов пауков следует искать в организме насекомых. Действие на млекопитающих может быть: (а) также биологически обоснованным и нести функцию защиты или нападения; (б) следствием гомологии молекул-мишеней из представителей различных таксонов; (в) случайным выполнением необходимых структурных требований к лигандам соответствующих рецепторов. Основными мишенями (рецепторами) охарактеризованных на сегодня дисульфид-содержащих пептидов из ядов пауков являются, в соответствии с их нейротоксическим эффектом, белковые компоненты мембран электровозбудимых клеток (нейронов и миоцитов). Это, прежде всего, различные потенциал-зависимые ионные каналы (калиевые, натриевые, кальциевые), но также хемо-, термо- и механовозбудимые ионотропные рецепторы (см. табл. 6), что является основным предметом многих обзоров [18, 23, 28, 29, 35, 36, 44].

По механизму действия исследованные в настоящее время пептидные нейротоксины из ядов пауков можно разделить на две большие группы. (I) Поровые блокаторы (прямое ингибирование ионной проводимости за счет взаимодействия с поровой областью рецепторов).

Например, хувентоксин-IV (P83303) из яда *H. schmidtii* и Tx1 (P17727) из яда бразильского странствующего паука *Phoneutria nigriventer* (семейство Stenidae) являются поровыми блокаторами Na⁺ каналов и взаимодействуют с т.н. сайтом 1, где связываются классические блокаторы этих каналов – тетродотоксин и сакситоксин, а также μ -конотоксины [229–233]. Аналогично и хувентоксин-XI (P68425) из яда паука *H. schmidtii* является типичным поровым блокатором K⁺ каналов, в его структуре присутствует характерная «функциональная диада» а.о., найденная у блокаторов калиевых каналов из различных источников и разнообразной 3D-структуры [221, 234]. Поровым блокатором кальциевых каналов предположительно является ω -агатоксин ША (P33034) [235]. (2) Модуляторы различного типа, воздействующие на процессы активации и инактивации соответствующих мишеней. Например, ханатоксины 1 и 2 (HaTx; P56852, P56853) из яда *G. rosea* взаимодействуют с потенциал-чувствительным доменом K⁺ каналов таким образом, что затрудняют процесс их активации [20, 21, 228, 236–238]. Аналогичным образом действует гомологичный ханатоксинам блокатор Ca²⁺ каналов ω -граммотоксин SIA (ω -GrTx SIA; P60590) из яда того же паука [239, 240]. Сходный эффект на Na⁺ каналы оказывают протоксины I и II (ProTx; P83476, P83480) из яда чилийского паука *Thrixopelma pruriens* (семейство Theraphosidae) [241, 242]. Более того, для этих токсинов характерна перекрестная активность, и они взаимодействуют с консервативной областью потенциал-чувствительных доменов ионных каналов, получившей название мотива «весла» (англ. paddle) [20, 21, 243–248]. Множество пептидов из ядов пауков являются модуляторами Na⁺ каналов, они замедляют процесс инактивации или вызывают сдвиг потенциала активации и взаимодействуют с т.н. сайтами 3 и 4 каналов – местами связывания α - и β -токсинов из ядов скорпионов, соответственно [233, 249, 250]. Например, главными токсичными компонентами ядов пауков из родов *Atrax* и *Hadronyche*, опасных для человека (табл. 1), служат δ -атракотоксины, которые подобно α -токсинам скорпионов замедляют инактивацию Na⁺ каналов и связываются с сайтом 3 [249, 251, 252]. Наиболее изученными являются δ -атракотоксины Ar1a (робустоксин; P01478) и Hv1a (версутоксин; P13494) – мажорные компоненты ядов *Atrax robustus* и *Hadronyche versuta*, соответственно (ЛД₅₀ ~0,2 мг/кг при подкожном и ~50–100 нг/кг при внутримозговом введении мышам) [253–256]. Точно так же за проявление симптомов токсичности у млекопитающих ответственны компоненты яда *P. nigriventer*, действующие на натриевые каналы сходным с δ -атракотоксинами образом: Tx2-1 (P29423), Tx2-5 (P29424), Tx2-6 (δ -CNTX-Pn2a; P29425) и

Tx2-9 (P29426) [257, 258], а пептид Tx4(6-1) (δ -CNTX-Pn1a; P59368) селективно действует на Na^+ каналы насекомых, также связываясь с сайтом 3 [259, 260]. Стоит отметить, что сегодня выпускаются эффективные противоядия, купирующие симптомы укусов опасных австралийских воронковых и южноамериканских странствующих пауков [17, 261]. Подобно β -токсинам скорпионов инсектотоксины воронковых пауков (μ -агатоксины I–VI из яда *A. aperta*, P11057–P11062, P60177, и куртатоксины I–III из яда *H. curta*, P15967, P15968, P60177) вызывают сдвиг потенциала активации Na^+ каналов, и, по-видимому, взаимодействуют с сайтом 4 [76, 262]. В то же время гомологичные последним δ -палутоксины IT1–IT4 (P83256–P83259) из яда азиатского паука *Pireneitega luctuosa* (семейство Amaurobiidae) тоже связываются с сайтом 4, однако ингибируют инактивацию каналов подобно α -токсинам скорпионов [263, 264].

Третий распространенный механизм действия пептидных нейротоксинов, характерный, например, для классических блокаторов ацетилхолинового рецептора из ядов змей и конусов, а именно конкурентное ингибирование за счет взаимодействия с центром связывания природного агониста [265], не характерен для токсинов пауков, но это может быть связано с недостаточностью наших знаний.

Недавние исследования позволили предложить два основных типа взаимодействия токсинов пауков с рецепторами: (а) мембрано-независимый, ассоциация с рецептором происходит напрямую из водного раствора, без контакта молекулы токсина с мембраной; (б) мембрано-опосредованный, в ходе взаимодействия с рецептором токсин формирует контакты с липидами мембран. Второй тип действия пока мало исследован, однако он характерен для некоторых классических непептидных токсинов и, по-видимому, широко распространен [20, 184, 245, 266–271]. Как уже отмечалось, основным структурным требованием к пептидам, взаимодействующим с мембранами, является свойство амфипатичности. Это свойство сближает нейротоксины, действующие по мембрано-опосредованному механизму, с ЦП и АМП, и они могут проявлять цитолитические свойства (см. главу IV).

Помимо разнообразия типов мишеней, для многих токсинов пауков характерна избирательность действия в отношении конкретных групп рецепторов. Лучшим примером служат, пожалуй, токсины, действующие на кальциевые каналы [272, 273]. Ранее (в главе II) уже говорилось о том, что в яде паука *A. aperta* содержатся разнообразные блокаторы Ca^{2+} каналов – ω -агатоксины. Эти пептиды составляют четыре семейства с различной специфичностью в отношении разных

типов кальциевых каналов млекопитающих, при этом обычной биологической мишенью их действия являются каналы насекомых [7, 227]. ω -Агатоксины IA и IB (P15969, P15970) – двухцепочечные (66 и 3 а.о.) пептиды с неизвестным типом укладки (для представителей других семейств характерен мотив цистинового узла), блокаторы каналов L-типа [212, 274–276]. ω -Агатоксины IIА и IIВ (90 и 95 а.о., P15971) действуют на каналы N-типа [276], тогда как ω -агатоксины IIIА–IIIД (76 а.о.; P33034, P81744–P81746), несмотря на гомологию с представителями семейства II, обладают широким спектром действия на L-, N-, P/Q- и R-типы каналов, исключение составили каналы T-типа [235, 277]. Наконец, ω -агатоксины IVA и IVB (48 а.о.; P30288, P37045) являются высокоспецифичными блокаторами каналов P/Q-типа [24, 77–79, 278, 279]. В яде другого хорошо исследованного паука *P. nigriventer* также присутствуют разнообразные пептиды, действующие на Ca^{2+} каналы [30]. Так, нейротоксин Tх3-2 (O76201) действует на L-тип каналов [280], Tх3-4 (Pn3-4а, ω -PTх-IIА; P81790) сходен по структуре с ω -агатоксинами III, необратимо ингибирует P/Q- и N-тип каналов, в то время как на R-тип его действие неполно и обратимо [281]; Tх3-3 (ω -PnTх3-3; P81789) и Tх3-6 (P81792) обладают широким спектром специфичности [282, 283]. Высокоселективные блокаторы кальциевых каналов в центральных нейронах насекомых были выделены из ядов пауков родов *Atrax* и *Hadronyche* – это более короткие атракотоксины семейства ω -ACTX-1 (36–37 а.о.) и более длинные представители семейства ω -ACTX-2 (42–44 а.о.) [15, 16]. Детально изучена активность ω -атракотоксинов Hv1a (P56207) и Hv2a (P82852) из яда *H. versuta*, при этом отношение концентраций токсинов, эффективных на каналах насекомых и млекопитающих, т.е. специфичность к представителям определенных систематических групп животных, достигает 10^4 [284–287]. Во всех указанных случаях имеет место как функциональное разнообразие, так и синергизм: воздействие на различные мишени в организме жертвы обеспечивает наибольшую эффективность действия смеси.

На наш взгляд, с учетом чрезвычайного разнообразия как самих пауков, так и пептидов в составе их ядов, вероятность обнаружения лиганда к практически любому наперед заданному рецептору достаточно высока, и это утверждение не раз получало экспериментальное обоснование. Например, в результате скрининга большой коллекции видов в яде паука-птицееда тринидадского шеврона *Psalmopoeus cambridgei* (Theraphosidae) был обнаружен псалмотоксин I (PcTx1; P60514), который с высокой аффинностью и селективностью блокировал подтип 1а кислоточувствительных каналов (ASICs, acid-sensing ion channels) [19, 288]. Целый ряд лигандов

механочувствительных каналов был получен из яда *G. rosea*: механотоксин- α (GsAF II, P61409), GsMTx-2 (P60273) и GsMTx-4 (Q7YT39) [27, 183, 185]. Наконец, в яде *P. cambridgei* были также найдены агонисты ваниллоидного рецептора TRPV1, названные ваниллотоксинами (VaTx 1–3; P0C244–P0C246) [26, 289].

Разнообразие мишеней действия дисульфид-содержащих пептидов из ядов пауков не ограничивается системами ионного транспорта. Например, из яда *H. schmidtii* был выделен лектино-подобный пептид хувенлектин-1 (SHLP-I; Q86C51), вызывающий агглютинацию эритроцитов [290, 291]. Заслуживает внимания также сообщение о выделении из яда *P. cambridgei* двух пептидов псалмопептоксинов I и II (PcFK; P0C201, P0C202) с антималярийными свойствами [292, 293]. Эти пептиды *in vitro* подавляют развитие малярийных плазмодиев *Plasmodium falciparum* внутри зараженных эритроцитов и не проявляют гемолитической, цитолитической и антимикробной активности, таким образом молекулярная мишень их действия неизвестна. Сообщается также, что пептид Tx3-4 из яда *P. nigriventer*, помимо действия на кальциевые каналы, обладает способностью блокировать обратный захват глутамата в синапсах, по-видимому, воздействуя на глутаматный транспортер [294, 295]. Функция некоторых пептидов, как в случае CSTX-13 из яда *C. salei*, может и вовсе состоять в потенцировании активности других компонентов [80].

VI. БЕЛКОВЫЕ КОМПОНЕНТЫ

Независимо от выбранной стратегии формирования компонентного состава (см. главу II) в ядах пауков, как правило, отмечают присутствие различных белков. Однако тщательное исследование разнообразия белковых компонентов с привлечением методов протеомики и геномики проведено лишь для ядов пяти видов пауков [4, 31, 32, 296–299]. Например, протеомные исследования ядов китайских тарантулов *Chilobrachys jingzhao* (*Chilobrachys guangxiensis*) и *H. schmidtii* (семейство Theraphosidae), богатых, в основном, пептидными компонентами, выявили присутствие, по крайней мере, 90 и 300 белков, соответственно, с Мм >10 кДа. Среди белков, для которых в базе UniProt [153] нашлись гомологи, оказались различные ферменты, транспортные, регуляторные и структурные белки, причем большая их часть, как правило, имеет внутриклеточную локализацию и выполняет определенные функции в клетке. Причины появления этих белков в ядах скорее всего связаны с апокриновым или голокриновым типом секреции ядовитых желез; они также могут попадать туда случайно вместе с секретируемыми токсинами или в результате загрязнения

образцов ядов, либо могут выполнять конкретные функции в самих ядах. Большинству белков не удалось приписать определенной функции, или для них вообще не нашлось известных гомологичных последовательностей, что может быть связано с недостатками метода идентификации [4, 31, 32].

Много публикаций посвящено характеристике различных ферментов в ядах пауков (протеаз, нуклеаз, липаз, гликозидаз и т.д.), однако результаты исследований иногда противоречат друг другу, что может быть следствием загрязнения образцов ядов, например, пищеварительными соками. Это, прежде всего, имеет отношение к протеолитическим ферментам, т.к. в чистых препаратах ядов протеолитическая активность, за редкими исключениями, отсутствует или очень низка [29, 74, 300–310]. Тем не менее, как уже отмечалось в случае ЦП, одной из функций компонентов ядов пауков может быть участие во внешнем пищеварении, и центральная роль в этом процессе может принадлежать ферментам. Часто встречаемым компонентом в ядах пауков является гиалуронидаза [94, 103, 306, 308, 311, 312]. Учитывая способность этого фермента разрушать структуру внеклеточного матрикса, гиалуронидазу принято рассматривать в качестве «фактора распространения» ядов; ту же функцию могут выполнять и протеазы [33, 38, 306, 309, 311, 313]. В отличие от пчел и змей [60, 61], пауки, похоже, редко продуцируют фосфолипазы типа А, хотя такие случаи и описаны [312, 314].

В 1994 г. появилась работа, в которой сообщалось о наличии в яде паука *A. aperta* фермента пептидил-изомеразы (код в базе данных UniProt AAB34913, AAB34914 [153]) [210, 315]. Этот фермент реализует конечную стадию биосинтеза ω -агатоксина IVB, меняя хиральность Ser46 (см. главу V). Похожая ситуация выноса конечных стадий биосинтеза с участием пептидил-изомераз во внеклеточное пространство встречается и у других ядовитых животных [316–318].

Белковым компонентам ядов большинства пауков чаще приписывают вспомогательные функции. Однако совсем иначе обстоит дело у пауков-отшельников из рода *Loxosceles* (семейство Sicariidae), распространенных, главным образом, в Западном полушарии. В их яде отмечено присутствие большого числа различных ферментов – фосфатаз, гиалуронидаз, фосфолипаз и различных протеаз [33, 301, 304–309, 319–321]. Основным компонентом их яда являются гомологичные белки-некротоксины (Мм 30–35 кДа), ответственные за проявление токсической активности. В биохимическом отношении эти белки – фосфолипазы типа D, которые из-за активности в отношении сфингомиелина стали также называть «сфингомиелиназы

D» [308, 320–324]. В настоящее время установлено строение целого ряда некротоксинов, а для одного из них (из яда *Loxosceles laeta*) получена кристаллическая структура (код в базе данных PDB 1XX1 [162]), выявившая чрезвычайно распространенную для разнообразных ферментов укладку типа «ТИМ-бочки» (англ. TIM barrel) [325]. Около десятка различных изоформ сфингомиелиназы D было идентифицировано в ядах трех видов *Loxosceles* с помощью протеомных исследований [326]. Проведено клонирование генов ряда токсинов, получены их рекомбинантные аналоги, вызывающие симптомы «локсосцелизма» (см. табл. 1), а также эффективные иммунные сыворотки, препятствующие развитию патологии [299, 308, 327–335]. Следует подчеркнуть, что подобные ферменты больше нигде не встречаются в животном мире, но найдены у некоторых бактерий, что наводит на мысль о достаточно древнем горизонтальном переносе генов, поскольку в составе генов пауков содержатся интроны [58, 336]. Несмотря на достигнутые успехи, до сих пор остаются невыясненными молекулярный механизм действия некротоксинов и основы их специфичности. Так, кролики и морские свинки обладают сходной с человеком чувствительностью к действию ядов *Loxosceles*, в то время как у мышей и крыс кожные язвы не образуются [337]. Показано участие определенных компонентов плазмы крови и иммунной системы жертвы в развитии некроза [320, 338–341]. Интересным открытием, расширяющим и без того широкую фармакологию сфингомиелиназы D, служит обнаружение явления активации K^+ каналов при действии фермента на клетки [342].

Пауки рода *Latrodectus* (семейство Theridiidae), известные в России и США под названиями каракурт и «черная вдова», принадлежат к наиболее опасным для человека видам паукообразных, поскольку в настоящее время противоядия не получили широкого распространения [17, 261]. В их ядах обнаружено семейство высокомолекулярных нейротоксинов ($M_m > 100$ кДа), обладающих сильным токсическим действием на различных животных [343, 344]. В ядах пауков близкого рода *Steatoda* обнаружены сходные белки [55, 345]. Исследованию латротоксинов и их рецепторов посвящено более 400 публикаций. Наиболее изучен α -латротоксин (α -LTX; P23631), эффективный по отношению к позвоночным животным. С помощью методов электрофизиологии удалось показать, что этот токсин вызывает истощающий выброс нейромедиаторов из нервных окончаний позвоночных животных, приводящий к блокаде передачи нервного импульса [346]. α -LTX стимулировал экзоцитоз и вызывал секрецию всех известных типов нейромедиаторов. Действие ток-

Таблица 7.
Характеристика латротоксинов

Название токсина	α -LTX	α -LIT	β -LIT	γ -LIT	δ -LIT	ε -LIT	α -LCT
Приблизительная Мм, кДа	130	120	140	120	110	110	120
ЛД ₅₀ , мкг/кг	20 ^а	15 ^б	25 ^б	250 ^б	60 ^б	1000 ^б	100 ^б

Тестирование проводилось на: ^амышях, ^бличинках большой воцинной огневки *Galleria mellonella*, ^вкубинских раках *Procambarus cubensis*.

сина сопровождалось деполяризацией мембраны и входом внутрь нейронов ионов кальция, однако наличие Ca^{2+} снаружи не являлось обязательным условием его действия (могли быть заменены на Mg^{2+}) [347, 348].

Фракционирование яда паука *Latrodectus mactans* позволило обнаружить в нем ряд белковых компонентов, активных по отношению к позвоночным, насекомым и ракообразным [349]. В настоящее время идентифицировано, по крайней мере, семь различных токсинов каракурта, служащих примером биомолекулярного разнообразия компонентов ядов пауков (см. главу II). Это токсин для позвоночных – α -латротоксин, пять токсинов для насекомых – латроинсектотоксинов: α -LIT (Q02989), β -LIT, γ -LIT, δ -LIT (Q25338) и ε -LIT, а также токсин для ракообразных – α -латрокрустотоксин (α -LCT; Q9XZC0) [350]. Данная номенклатура является общепринятой для токсинов каракурта и родственных пауков, ее не следует путать с номенклатурой для пептидных токсинов (см. главу V). Латротоксины представляют собой высокомолекулярные белки с Мм > 100 кДа (табл. 7). В электрофизиологических исследованиях все токсины данного семейства стимулировали выброс нейромедиаторов из нервных окончаний у соответствующих животных. Латроинсектотоксины не оказывали видимого эффекта на позвоночных и ракообразных (табл. 8), а латрокрустотоксин не влиял на насекомых и мышей [351–353]. Эти результаты прямо коррелировали с данными по измерению связывания радиоактивно меченых α -LTX и α -LIT с препаратами нейрональных мембран позвоночных и насекомых [354]. По-видимому, паук каракурт секретирует токсины, наиболее совершенные по своей специфичности к представителям определенных систематических групп животных. При этом объединение спектров действия различных токсинов приводит к широкой специфичности действия цельного яда. Одним из основных проявлений действия латротоксинов является образование в искусственных мембранах пор, проницаемых для катионов [355, 356]. Специфичное же действие токсинов на клеточные мембраны опосредовано специализированными рецепторами.

Таблица 8.
Токсическая активность α -латроинсектотоксина

Тестируемое животное	ЛД ₅₀ , мкг/кг
<i>Galleria mellonella</i> (моль)	15
<i>Periplaneta americana</i> (таракан)	27
<i>Nauphoeta cinerea</i> (таракан)	45
<i>Gryllodes supplicans</i> (сверчок)	35
<i>Musca domestica</i> (муха)	20 – ЛД ₁₀₀ *
<i>Procambarus cubensis</i> (рак)	7,5 мг/кг – нет эффекта
Мыши	12 мг/кг – нет эффекта
Лягушки	7,5 мг/кг – нет эффекта

*ЛД₁₀₀ – доза, вызывающая гибель 100% испытываемых животных.

Благодаря работам 1990-х гг., установлено строение четырех латротоксинов [34, 357–360]. Три из них (α -LTX, α -LIT и α -LCT) состоят из ~1100–1200 а.о., а δ -LIT – из ~1000 а.о.; по-видимому, все латротоксины содержат несколько доменов (рис. 6). Сравнение структур токсинов выявило довольно высокий уровень их гомологии (в среднем, свыше 30% идентичных а.о.). *N*-Концевая часть латротоксинов не имеет заметного сходства с известными белками, в то время как в центральной части молекулы тандемно расположены анкириновые повторы, построенные из ~30–35 а.о. Подобные повторы встречаются в сотнях белков, обладающих самыми разными функциями, и, как полагают, необходимы для белок-белковых взаимодействий [361, 362]. В латротоксинах число анкириновых повторов варьирует от 13 для δ -LIT до 20 для α -LTX. Повторы 15–17 у α -LTX, α -LIT и α -LCT содержат необычные кластеры из шести остатков цистеина, отсутствующие у δ -LIT. Интересная особенность данных токсинов заключается в наличии у них в *N*-концевой части молекулы двух консервативных гидрофобных участков длиной ~30 а.о. Таким образом, в структуре латротоксинов можно выделить две основные части: *N*-концевую с двумя консервативными гидрофобными участками и центральную – с анкириновыми повторами [34].

Даже высокоочищенные препараты α -LTX содержат два компонента с Мм ~130 и 8 кДа. Низкомолекулярный компонент (латродектин, LMWP; P49125) состоит из 70 а.о. с тремя внутримолекулярными дисульфидными связями [363–365]. LMWP не обладает собственной токсичностью, не имеет порообразующей активности в бислойных

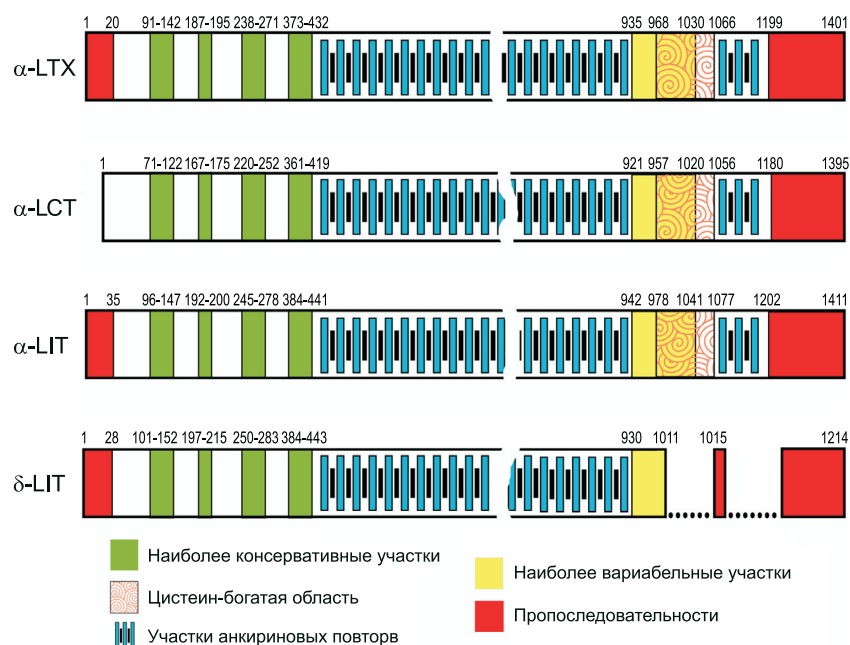


Рис. 6. Организация аминокислотной последовательности латротоксинов.

Схематично показаны установленные последовательности протоксина α -LTX (P23631), α -LCT (Q9XZC0), α -LIT (Q02989) и δ -LIT (Q25338) в соответствии с аннотацией в базе данных UniProt [153]. Профрагменты выделены красным. В зрелых цепях отмечено положение анкириновых повторов, цистеин-богатого кластера (узором), а также наиболее консервативных (зеленым) и, напротив, наиболее переменных (желтым) участков. В последовательность δ -LIT внесены разрывы для оптимизации сравнения с другими латротоксинами.

липидных мембранах и по своему строению напоминает гипергликемический гормон ракообразных [366]. Предполагается, что его функциональная роль заключается в стабилизации структуры и, следовательно, потенцировании биологической активности α -LTX; кроме того, этот полипептид, по-видимому, снижает селективность действия латротоксина, что также оправдано биологически [367].

Попытки получить кристаллы α -LTX до сих пор не увенчались успехом. В то же время с помощью электронной микроскопии были получены весьма интересные данные о его пространственном строении. Уже первые работы показали, что α -LTX существует в виде олигомера [368]. В дальнейшем с применением криоэлектронной микроскопии была установлена его пространственная структура с разрешением около 15 Å. Показано, что токсин находится в форме

тетрамера [369], причем симметричный тетрамер образуется только в присутствии ионов кальция или магния, а в их отсутствие α -LTX существует в виде стабильного несимметричного гомодимера. В структуре мономера выделяются три домена, а тетрамерная форма имеет в своем центре канал диаметром ~ 10 Å в самом узком месте. Предполагается, что именно тетрамер токсина способен встраиваться в мембрану, образуя ионную пору. Действительно, количество тетрамерной формы α -LTX явно коррелирует с его способностью стимулировать экзоцитоз нейромедиатора [370]. По-видимому, Ca^{2+} -зависимый эффект латротоксинов связан с их тетрамеризацией и встраиванием в пресинаптическую мембрану с образованием поры, что приводит ко входу ионов кальция внутрь нервного окончания.

Как уже отмечалось, связывание α -LTX с клеточной мембраной опосредовано специальными рецепторами. Для локализации рецепторов в качестве инструмента исследования использовался меченый токсин. Кроме того, были получены аффинные сорбенты с иммобилизованным α -LTX [371–373]. В настоящее время идентифицированы три различных рецептора/акцептора этого токсина: нейрексин Ia, латрофилин и тирозинфосфатаза σ , среди которых латрофилин является G-белок-сопряженным рецептором [374–378]. Установлено, что для проявления порообразующей активности и, следовательно, токсического эффекта для α -LTX достаточно наличия мембранного рецептора и не требуется взаимодействия с другими пресинаптическими белками. Связывание с нейрексином происходит только в присутствии ионов кальция, в то время как взаимодействие с другими рецепторами не зависит от Ca^{2+} . Далеко не все эффекты α -LTX можно объяснить его каналобразующими свойствами. Помимо встраивания в нейрональную мембрану и образования поры, α -LTX способен после связывания с латрофилином либо с тирозинфосфатазой модулировать активность фосфолипазы C и вызывать освобождение ионов кальция из внутриклеточных депо [379, 380]. Рецепторы латроинсектотоксинов сегодня неизвестны, несмотря на наличие в геномах насекомых гомологов всех трех типов рецепторов α -латротоксина [14, 381]. Гомолог латрофилина обнаружен в геноме нематоды *Caenorhabditis elegans*; показано, что этот белок отвечает за проявление сильного токсического эффекта латротоксинов (по-видимому, ϵ -LIT; $\text{LD}_{50} \sim 1\text{--}2$ мкг/кг) у этих животных [382].

Необходимо отметить, что α -LTX является в настоящее время одним из наиболее эффективных инструментов исследования молекулярных процессов экзоцитоза нейромедиаторов. Несомненно, что дальнейшее изучение латротоксинов и их рецепторов будет иметь

огромное значение для познания молекулярных механизмов нейросекреции [14, 380, 383].

Итак, белковые компоненты ядов пауков выполняют разнообразные функции: оказывают прямой токсический эффект (являются некротоксинами или нейротоксинами), выступают как «факторы распространения» ядов (ферменты, разрушающие тканевые структуры) и участвуют в конечных стадиях созревания токсинов.

VII. БИОСИНТЕЗ КОМПОНЕНТОВ ЯДОВ ПАУКОВ

Механизм биосинтеза различных компонентов ядов пауков исследован в разной степени, однако в целом этот вопрос недостаточно изучен. Так, в литературе отсутствуют данные о биосинтезе низкомолекулярных компонентов, включая хорошо известные АП. Что касается полипептидов, то информация о механизме их продукции весьма разнообразна, хотя и можно говорить о понимании общей схемы процесса [85].

В настоящее время установлено строение генов, кодирующих весьма ограниченный набор полипептидов из ядов пауков. К ним относятся инсектотоксины паука *Diguetia canities* [384], ряд пептидных нейротоксинов *H. schmidt* [385, 386], сфингомиелиназы D нескольких видов *Loxosceles* и *Sicarius* [330, 335] и некоторые латротоксины [360, 387]. Интересной особенностью генов пептидов *H. schmidt*, а также латротоксинов, является отсутствие интронов, что уникально в сравнении с генами токсинов других животных и более характерно для бактериальных белков. Наибольший массив информации о созревании полипептидных компонентов ядов получен при анализе мРНК (точнее кДНК) из ядовитых желез. Для нескольких видов пауков получены библиотеки кДНК, содержащие не одну сотню последовательностей [4, 45, 46, 48, 330].

Все латротоксины синтезируются, по-видимому, в виде неактивных предшественников (рис. 6). Молекула протоксина претерпевает процессинг, при котором протеаза кексинового/фуринового типа (см. также ниже) отщепляет *N*-концевой (~20–30 а.о.) и *C*-концевой (достигающий ~200 а.о.) фрагменты [359, 360, 367, 387]. Таким образом, молекулы предшественников латротоксинов можно разделить на три участка: отщепляемые при созревании *N*- и *C*-концевые фрагменты и образующаяся зрелая цепь.

Пептидные компоненты ядов пауков синтезируются обычно в виде предшественников, в составе которых можно выделить три основных элемента. (1) Поскольку все рассматриваемые молекулы являются секретлируемыми, в состав предшественников входят *N*-концевые

т.н. сигнальные или лидерные (пре-) пептиды, обуславливающие котрансляционное поступление растущей полипептидной цепи в эндоплазматический ретикулум (ЭР). (2) Для подавляющего большинства известных предшественников токсинов характерно наличие пропоследовательностей (профрагментов), удаляемых посттрансляционно в ходе т.н. ограниченного протеолиза. Функция пропоследовательностей почти не исследовалась, но, по-видимому, она состоит в обеспечении корректности созревания пептидов: их сворачивания (фолдинга) и секреции (сортинга). В случае ЦП функция этих элементов может заключаться в блокировании активности зрелых цепей, и тем самым, в защите клеток-продуцентов от цитолиза [154, 388, 389]. (3) Последовательности, соответствующие зрелым пептидам, расположены в С-концевой области предшественников. Таким образом, структурная организация предшественников описывается термином препропептиды. Похожая организация наблюдается в случае многих секретируемых молекул, в том числе, например, коптоксинов [86].

На рис. 7 представлена схема процессинга предшественников пептидов из ядов пауков. Первоначальное разделение молекулы препропептида, а именно отделение лидерного пептида сигнальными пептидазами, происходит на входе в ЭР [390]. Следующая стадия ограниченного протеолиза препептида специфическим ферментом приводит к удалению пропоследовательности. Важным открытием стало обнаружение мотивов, определяющих протеолиз предшественников токсинов и ЦП из ядов пауков. Мотивы получили название PQM (processing quadruplet motif) (на рис. 7 обозначен красной стрелкой) и iPQM (inverted PQM) [45, 85]. Мотив PQM описывается формулой $X_1X_2X_3R$, где любой $X_n = E$. Иначе говоря, по общепринятой номенклатуре Шехтера-Бергера [391] остатком P1, формирующим гидролизуемую связь P1-P1', является остаток аргинина, а в положениях P2-P4 (иногда до P6) расположен остаток глутаминовой кислоты. Мотив iPQM является симметричной копией PQM: положение P1 также занято остатком аргинина, а остаток глутамата лежит в области P1'-P5'. Предложено также мнемоническое описание этих мотивов процессинга – *EtoR/EafterR*, отражающее взаимное расположение ключевых а.о.

Мотивы PQM и iPQM отличаются от классических «двухосновных» *R(K)toR* мотивов, найденных у огромного числа предшественников пептидов различных животных и узнаваемых субтилизин-подобными ферментами процессинга кексинового/фуринового типа [85, 392]. Отметим, что на сегодняшний день ферменты ограниченного протеолиза в ядовитых железах пауков не найдены, как неизвестна и их лока-

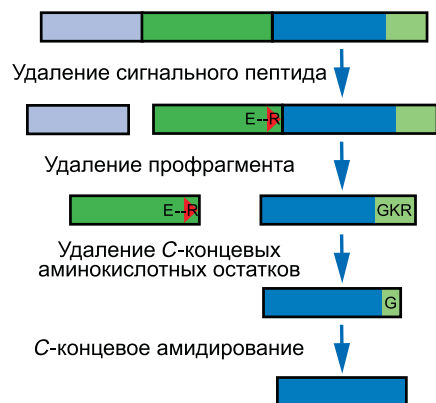


Рис. 7. Схема процессинга предшественников пептидов из ядов пауков.

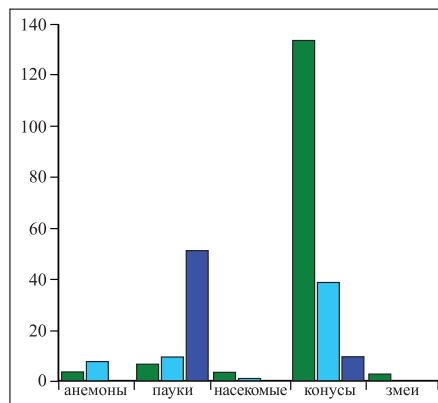
Отмечены основные стадии созревания, а также ключевые участки аминокислотной последовательности предшественников. Сигнальный пептид окрашен голубым цветом, профрагменты – зеленым и салатным, последовательность зрелой цепи – синим. Мотив PQM (processing quadruplet motif) обозначен красной стрелкой.

лизация, а соответственно, и место секреторного пути, где проходит созревание – от ЭР до внеклеточного пространства. В связи с этим стоит еще раз упомянуть пептидил-изомеразу (см. главу VI), а также отметить присутствие в ядах некоторых пауков незрелых предшественников токсинов. Это, с одной стороны, может быть случайным следствием механизма секреции или отбора ядов, а с другой – указывать на внеклеточный процессинг этих пептидов [31, 393, 394]. Кроме того, обнаруживаемые в ядах протеазы, как правило, низкой активности (см. главу VI) могут быть ферментами ограниченного протеолиза. Последующее рассмотрение белков-предшественников из различных животных выявило, что мотив *EtoR/EafterR*, похоже, встречается чаще и характерен не только для токсинов [85]. Анализ известных предшественников токсинов, продуцируемых животными разных систематических групп, показал, что созревание по мотиву PQM характерно практически для всех токсинов пауков (см. рис. 8), за редким исключением, например, токсина *magi-4* (P83560) из яда паука *Macrothele gigas* (семейство Hexathelidae) [395]. Токсины скорпионов, актиний, змей и насекомых, по-видимому, созревают по мотиву *R(K)toR*. Токсины конусов в основном также относятся к группе с мотивом *R(K)toR*, узнаваемым процессирующими протеазами кексинового/фуринового типа, хотя известно большое количество конотоксинов, созревающих при участии других протеолитических ферментов [396]. Таким образом, созревание пептидных компонентов ядов пауков отличается от процессов, известных для всех остальных ядовитых животных. Отметим, что обнаружение мотивов *EtoR/EafterR* хорошо предсказывает структуру зрелых молекул, и это особенно важно при анализе транслированных нуклеотидных последовательностей. Например, разрезание предшественников ω -агатовоксинов IA и IB

Рис. 8. Диаграмма распространения мотивов ограниченного протеолиза в белках-предшественниках токсинов из различных групп животных.

Зеленые столбцы – мотив *R(K)toR*; синие – мотив *EtoR/EafterR*; голубые – присутствуют оба мотива.

Высота столбцов соответствует числу известных белков-предшественников токсинов, содержащих данный тип мотивов.



(P15969, P15970) на две цепочки точно обозначено симметричными RQM и iRQM.

Часто предшественники, помимо отделения пропоследовательностей, претерпевают дополнительные посттрансляционные превращения. С-Концевое амидирование включает отщепление С-концевого остатка глицина с одновременным формированием амида у предыдущего а.о. За этот процесс отвечает т.н. амидирующий фермент или пептидилглицин α -амидирующая монооксигеназа. Оказалось, что на самом деле это комплекс, состоящий из двух ферментов: пептидил- α -гидроксилирующей монооксигеназы, преобразующей остаток глицина в α -гидроксилированный промежуточный продукт, и пептидил- α -гидроксилированный α -амидирующей лиазы, катализирующей отщепление гидроксилата с образованием конечного амида [397]. Отщепление С-концевых положительно заряженных а.о. осуществляют карбоксипептидазы типа D или E [398, 399]. Изменение хиральности одного из а.о. у ω -агатоксина IVB (P37045) обсуждалось выше (см. главу VI), а механизм модификации PLTX-II (P34079) пальмитиновой кислотой в настоящее время неизвестен.

Предшественники ЦП, по-видимому, характеризуются большим разнообразием, однако в настоящее время известны последовательности кДНК только для пептидов из яда *L. tarabaevi* [62, 63]. Для большинства ЦП характерна структура предшественников, описанная выше с единственным мотивом RQM. В составе других обнаружено сразу два («двойные» предшественники) и более («сложные» предшественники) мотивов RQM, а также iRQM, в результате чего эти молекулы процессируются с образованием нескольких зрелых пептидов. На наш взгляд, разнообразие строения предшественников полипептидов из ядов пауков раскрыто далеко не полностью.

VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение яда пауков, которое вначале было продиктовано стремлением выяснить природу «действующего начала», понять механизм действия опасных для человека токсинов и создать соответствующие противоядия, сегодня гораздо более многопланово: открывшееся молекулярное разнообразие ядов обусловило широту возможностей их применения.

Оказалось, что в состав яда пауков входят самые разнообразные компоненты, имеющие различные мишени и направленно модулирующие множество физиологических процессов. Эти уникальные смеси можно рассматривать, таким образом, как природные фармакопеи, а основной практический интерес к ним в настоящее время вызван возможностью получения новых фармакологических препаратов. Фундаментальный интерес к компонентам ядов заключается в получении высокоселективных инструментов исследования их мишеней, о чем не раз говорилось выше. Что касается практического интереса, то среди, пожалуй, каждой группы соединений из ядов пауков (в соответствии с главами обзора) находятся кандидаты на создание лекарственных препаратов.

Например, малоизученные сульфатированные нуклеотиды, по-видимому, могут вмешиваться в различные процессы, проходящие с участием обычных нуклеотидов [106]. АП предложено использовать в разнообразных целях, наиболее интересной, с нашей точки зрения, служит направленное воздействие на возбуждающую активность глутаматных рецепторов и предотвращение тем самым развития эпилептических явлений [400, 401]. При укусах ядовитых животных очевидным кажется использование очищенных препаратов полипептидных токсинов или их рекомбинантных аналогов для получения эффективных сывороток [261, 334]. Интерес к ЦП вызван их антимикробной активностью; предполагается, что ЦП (АМП) станут новым поколением антибиотических средств, которые будут введены в клиническую практику на фоне снижения потенциала обычных антибиотиков ввиду развития устойчивости к ним у патогенных микроорганизмов. Тем не менее, прежде всего необходимо решить две главные задачи: повышение эффективности и специфичности ЦП в отношении клеток патогенов и создание технологии их получения в промышленных масштабах для широкого практического использования [158, 159, 388, 389, 402–404]. Наибольшие перспективы, пожалуй, за дисульфид-содержащими пептидами. Относительная простота строения молекул, их стабильность, специфичность и эффективность действия, разнообразие распознаваемых рецепторов, а

также комбинаторика аминокислотных последовательностей являются отличительными качествами этой группы соединений, позволяющими проводить рациональный дизайн лекарственных препаратов на их основе. Примером служит блокатор протонактивируемых каналов (ASICs), играющих первостепенную роль в генерации болевых стимулов. Этот пептид является прототипом анальгетического средства нового поколения [19, 22, 25, 288]. Одной из актуальных проблем современной медицины выступают «каналопатии» – заболевания, вызванные дисфункцией ионных каналов. Селективные лиганды, связывающиеся с этими белками, могут возвращать их активности к физиологической норме и, таким образом, устранять патологию. При этом полезными могут оказаться не блокаторы, а более «мягкие» модуляторы, изменяющие уровень активности мишеней, а не полностью угнетающие ее [405–408].

Другой аспект практического интереса к ядам пауков заключается в следовании биологической логике: поскольку основной добычей пауков служат насекомые, то содержащиеся в их ядах инсектотоксины могут быть использованы как биоинсектициды в «зеленой» биотехнологии для снижения потерь в сельском хозяйстве. Предложено много способов реализации этой идеи, например, создание трансгенных растений, продуцирующих токсины [409–411]. Наибольший интерес представляет создание вирусных векторов, поражающих организм насекомых (например, на основе бакуловирусов) и содержащих гены токсинов; в этом случае автоматически решается проблема доставки токсина к его мишени в организме жертвы [13–16]. ЦП также могут быть использованы для получения устойчивых к заболеваниям трансгенных растений или как биопестициды [412–415].

Итак, вопросы в исследовании яда пауков «сегодняшнего дня», в основном, сугубо практические и касаются технологии поиска новых компонентов с заданными свойствами для создания на их основе лекарственных прототипов или инсектицидов. Существуют, однако, вопросы и задачи «дальней перспективы», требующие от нас нового уровня понимания проблемы. Назовем некоторые из них.

(1) Как формируется молекулярное многообразие яда? Каков механизм возникновения природных комбинаторных библиотек соединений? Источники разнообразия могут исследоваться на разных уровнях: дубликации генов, альтернативного сплайсинга, РНК-редактирования, процессинга белков-предшественников и посттрансляционных модификаций. Сегодня, в отсутствие информации о геноме пауков и других ядовитых животных с биомолекулярным разнообразием компонентов яда, сложно ответить на эти вопросы.

Более того, даже подтверждение предположения о существовании мультигенных семейств токсинов еще не дает исчерпывающего ответа. Действительно, анализ существующих данных показывает, что различия между генами токсинов распределены неравномерно: последовательности сигнальных пептидов наиболее консервативны, а зрелых цепей, напротив, гипервариабельны, при этом остатки цистеина сохраняют инвариантность (табл. 3, 4) [49, 203]. Повышенная вариабельность генов токсинов описывается термином «ускоренной» эволюции, характерной для генов, контролирующих взаимодействия с изменчивыми факторами [75]. Механизм избирательного внесения мутаций в область гена, соответствующую зрелой цепи, и защиты кодонов цистеина только предстоит узнать.

(2) Каковы реальные масштабы природного разнообразия? Как уже отмечалось, в настоящее время исследованы яды только около сотни видов пауков, т.е. ~0,25% известного видового разнообразия. Заметим, что многие пауки характеризуются малыми размерами и из них можно получить лишь доли мкл яда. В этом одна из причин крайней скудности или вовсе отсутствия информации о ядах представителей многих семейств. Для широких исследований этих объектов стандартные методы фракционирования и установления структуры активных компонентов не являются оптимальными, требуются новые технологии. Перспективным в этом отношении оказывается подход, объединяющий в себе генетические (получение кДНК из ядовитых желез) и протеомные или пептидомные (основанные на аналитических методах хроматографии и масс-спектрометрии) методы [3, 4, 46, 152, 416]. Кроме того, ввиду широты масштабов ожидаемого молекулярного разнообразия (несколько десятков миллионов или более индивидуальных соединений), для эффективного анализа активности новых открываемых компонентов, а также для поиска веществ с заданными свойствами потребуются не только новые методы анализа многообразия, но также новые методы скрининга.

(3) Наконец, в завершении обзора мы ставим следующий вопрос: чему современные исследователи смогут научиться у пауков и смогут ли они затем превзойти их искусство? Действительно, на счету пауков целый ряд достижений в области биологической химии. Это и аппарат комбинаторной химии органических соединений, и комбинаторные библиотеки полипептидных соединений с общим типом укладки, и сложные многодоменные белки с высочайшей селективностью действия, и, естественно, паутина. Хочется надеяться, что все эти достижения будут восприняты и использованы человеком.

IX. Приложение.**НЕКОТОРЫЕ ФАКТЫ БИОЛОГИИ ПАУКОВ**

Пауки (отряд Araneae, класс Arachnida, подтип Chelicerata, тип Arthropoda) представляют собой одну из наиболее успешных в эволюционном отношении групп живых существ. Они появились на земле более 300 миллионов лет назад и до сих пор процветают. Следом за насекомыми, которые в значительной степени являются основой их рациона, пауки – наиболее распространенные и разнообразные существа. Действительно, представители свыше 40 тысяч описанных в настоящее время видов пауков [200, 201] живут на Земном шаре практически повсеместно и занимают различные экологические ниши от пустынь до водоемов, от подземного мира пещер до высокогорья. Такое широкое распространение пауков – результат свойственного этим организмам поразительного биологического многообразия, уже отмеченного видового, морфологического, поведенческого, но также разнообразия химического, молекулярного. Среди пауков можно встретить лилипутов (длина тела менее 0,5 мм) и гигантов (размах ног свыше 25 см) (для пауков также характерен половой диморфизм, и самки могут более чем в сто раз превосходить самцов по весу), короткоживущих и долгожителей (продолжительность жизни от нескольких месяцев до десятков лет), одиночек и социальных (с общей сетью паутины, при этом особи передают друг другу вибрационные сигналы). В отличие от насекомых, пауки имеют четыре пары ног (а также хелицеры и педипальпы) и простые глаза. Окраска пауков весьма разнообразна, в основном, это цвета, делающие их незаметными, но встречаются и яркие окраски, особенно у тропических видов. Почти все без исключения пауки хищники и питаются живой добычей, однако они способны несколько недель обходиться без пищи [417–421].

Для пауков характерна мимикрия. Они могут практически сливаться с цветками или напоминать веточку, но самой удивительной представляется их способность быть похожими на свои жертвы, например, муравьев, пчел, мух. Так, некоторые пауки-«скакуны» из семейства Salticidae приспособились жить среди муравьев и охотиться на них. При этом мимикрия осуществляется как на морфологическом (форма тела приобретает черты, характерные для этих насекомых) и поведенческом (пауки используют переднюю пару ног, как муравьи – антенны) уровнях, так и на химическом уровне (выделяют феромоны, характерные для муравьев) [422–425]. Пауки – прирожденные охотники, быстрота их реакции практически не имеет аналогов у наземных животных. По-видимому, из всех членистоногих именно у

пауков наиболее централизованная нервная система, уступающая по этому показателю у беспозвоночных, пожалуй, только головоногим моллюскам. Охотничьи приемы у пауков чрезвычайно разнообразны. Некоторые используют сложные сети паутины и сидят в ожидании запутавшейся жертвы, другие забрасывают паутину как невод, третьи (американские пауки-«арканщики» из рода *Mastophora*) вырабатывают химические вещества, являющиеся феромонами бабочек, чем привлекают тех с больших расстояний, четвертые вообще не используют паутину и являются «активными» охотниками [417–419, 426–429]. В случае поражения ядовитой добычей некоторые пауки проводят аутономию поврежденной конечности [430]. Многие пауки обладают удивительной способностью ходить по гладким вертикальным поверхностям и потолку, что объясняется наличием тысяч тончайших волосков на ногах, формирующих с поверхностью контакты на микроскопических расстояниях, или использованием специального типа паутинового шелка [431–433].

Сильно упрощая, можно сказать, что в эволюции пауков решающую роль сыграли два фактора, являющиеся отличительными признаками этих существ, – изобретение паутины и разработка ядовитого аппарата. Первый фактор, паутина – уникальный природный материал белковой природы, технические характеристики которого намного превосходят применяющиеся в настоящее время синтетические волокна. Многие пауки искусные ткачи, и здесь тоже проявляется свойство многообразия: существует несколько типов нити в зависимости от назначения, кроме того, пауки из разных семейств ткнут различные по структуре сети. Удивительным кажется тот факт, что от обыкновенного для Европы крестовика можно получить нить длиной до нескольких десятков и даже сотен метров [434–438]. Второму фактору, яду пауков, посвящена эта обзорная статья. Для охоты и защиты большинство пауков используют крепкие хелицеры, на когтевидном концевом членике которых открываются протоки ядовитых желез.

Благодаря своим ярким отличительным поведенческим и морфологическим особенностям пауки с древнейших времен появляются в искусстве, религии и философии различных культур, символизируя терпение и выдумку, но также зло и коварство. Несмотря на довольно распространенную у современных людей склонность к арахнофобии, стоит признать, что эти удивительные животные таят в себе уникальную природную информацию, раскрыть неисчерпаемые богатства которой помогает современная наука.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bettini, S., Alsop, D.W. (1978) Arthropod venoms. Berlin; New York: Springer-Verlag, xxxiii, 977 p.
2. Mebs, D. (2002) Venomous and poisonous animals: a handbook for biologists, toxicologists and toxinologists, physicians and pharmacists. Stuttgart; Boca Raton: Medpharm; CRC Press, ix, 339 p.
3. Escoubas, P., Quinton, L., Nicholson, G.M. (2008) *J. Mass Spectrom.*, **43**, 279–295.
4. Liang, S. (2008) *Expert Rev. Proteomics*, **5**, 731–746.
5. Vapenik, Z., Nentwig, W. (2000) *Toxicon*, **38**, 293–298.
6. Kuhn-Nentwig, L., Schaller, J., Nentwig, W. (2004) *Toxicon*, **43**, 543–553.
7. Adams, M.E. (2004) *Toxicon*, **43**, 509–525.
8. Wullschleger, B., Nentwig, W., Kuhn-Nentwig, L. (2005) *J. Exp. Biol.*, **208**, 2115–2121.
9. Herzig, V., Khalife, A.A., Chong, Y., Isbister, G.K., Currie, B.J., Churchill, T.B., Horner, S., Escoubas, P., Nicholson, G.M., Hodgson, W.C. (2008) *Toxicon*, **51**, 1167–1177.
10. Wigger, E., Kuhn-Nentwig, L., Nentwig, W. (2002) *Toxicon*, **40**, 749–752.
11. Malli, H., Kuhn-Nentwig, L., Imboden, H., Nentwig, W. (1999) *J. Exp. Biol.*, **202**, 2083–2089.
12. Boeve, J.L., Kuhn-Nentwig, L., Keller, S., Nentwig, W. (1995) *Toxicon*, **33**, 1347–1357.
13. Nicholson, G.M. (2007) *Toxicon*, **49**, 490–512.
14. Rohou, A., Nield, J., Ushkaryov, Y.A. (2007) *Toxicon*, **49**, 531–549.
15. King, G.F. (2007) *Toxicon*, **49**, 513–530.
16. Tedford, H.W., Sollod, B.L., Maggio, F. King, G.F. (2004) *Toxicon*, **43**, 601–618.
17. Vetter, R.S., Isbister, G.K. (2008) *Annu. Rev. Entomol.*, **53**, 409–429.
18. Estrada, G., Villegas, E., Corzo, G. (2007) *Nat. Prod. Rep.*, **24**, 145–161.
19. Diochot, S., Salinas, M., Baron, A., Escoubas, P., Lazdunski, M. (2007) *Toxicon*, **49**, 271–284.
20. Huang, P.T., Shiau, Y.S., Lou, K.L. (2007) *Toxicon*, **49**, 285–292.
21. Swartz, K.J. (2007) *Toxicon*, **49**, 213–230.
22. Rajendra, W., Armugam, A., Jeyaseelan, K. (2004) *Toxicon*, **44**, 1–17.
23. Grishin, E. (1999) *Eur. J. Biochem.*, **264**, 276–280.
24. Olivera, B.M., Miljanich, G.P., Ramachandran, J., Adams, M.E. (1994) *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, 823–867.
25. Lewis, R.J., Garcia, M.L. (2003) *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **2**, 790–802.
26. Cromer, B.A., McIntyre, P. (2008) *Toxicon*, **51**, 163–173.
27. Bowman, C.L., Gottlieb, P.A., Suchyna, T.M., Murphy, Y.K., Sachs, F. (2007) *Toxicon*, **49**, 249–270.
28. Corzo, G., Escoubas, P. (2003) *Cell. Mol. Life Sci.*, **60**, 2409–2426.
29. Rash, L.D., Hodgson, W.C. (2002) *Toxicon*, **40**, 225–254.
30. Gomez, M.V., Kalapothakis, E., Guatimosim, C., Prado, M.A. (2002) *Cell. Mol. Neurobiol.*, **22**, 579–588.
31. Liao, Z., Cao, J., Li, S., Yan, X., Hu, W., He, Q., Chen, J., Tang, J., Xie, J., Liang, S. (2007) *Proteomics*, **7**, 1892–1907.
32. Yuan, C., Jin, Q., Tang, X., Hu, W., Cao, R., Yang, S., Xiong, J., Xie, C., Xie, J., Liang, S. (2007) *J. Proteome Res.*, **6**, 2792–2801.
33. da Silva, P.H., da Silveira, R.B., Appel, M.H., Mangili, O.C., Gremski, W., Veiga, S.S. (2004) *Toxicon*, **44**, 693–709.
34. Grishin, E.V. (1998) *Toxicon*, **36**, 1693–1701.

35. *de O. Belebani, R., Pizzo, A.B., Fontana, A.C., de, O.G.C.R., Coutinho-Netto, J. Dos Santos, W.F.* (2004) *Eur. J. Pharmacol.*, **493**, 1–17.
36. *Escoubas, P., Diocot, S., Corzo, G.* (2000) *Biochimie*, **82**, 893–907.
37. *Jackson, H., Parks, T.N.* (1989) *Annu. Rev. Neurosci.*, **12**, 405–414.
38. *Kuhn-Nentwig, L.* (2003) *Cell. Mol. Life Sci.*, **60**, 2651–2668.
39. База данных молекул с укладкой типа «цистинового узла». The KNOTTIN database: <http://knottin.cbs.cnrs.fr>.
40. *Mouhat, S., Jouirou, B., Mosbah, A., De Waard, M., Sabatier, J.M.* (2004) *Biochem. J.*, **378**, 717–726.
41. *Norton, R.S., Pallaghy, P.K.* (1998) *Toxicon*, **36**, 1573–1583.
42. *Craik, D.J., Daly, N.L., Waine, C.* (2001) *Toxicon*, **39**, 43–60.
43. *Gracy, J., Le-Nguyen, D., Gelly, J.C., Kaas, Q., Heitz, A., Chiche, L.* (2008) *Nucleic Acids Res.*, **36**, D314–D319.
44. *Escoubas, P., Rash, L.* (2004) *Toxicon*, **43**, 555–574.
45. *Kozlov, S., Malyavka, A., McCutchen, B., Lu, A., Schepers, E., Herrmann, R., Grishin, E.* (2005) *Proteins*, **59**, 131–140.
46. *Escoubas, P., Sollod, B., King, G.F.* (2006) *Toxicon*, **47**, 650–663.
47. *Escoubas, P.* (2006) *Mol. Divers.*, **10**, 545–554.
48. *Chen, J., Deng, M., He, Q., Meng, E., Jiang, L., Liao, Z., Rong, M., Liang, S.* (2008) *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 2431–2444.
49. *Sollod, B.L., Wilson, D., Zhaxybayeva, O., Gogarten, J.P., Drinkwater, R. King, G.F.* (2005) *Peptides*, **26**, 131–139.
50. *Olivera, B.M., Hillyard, D.R., Marsh, M. Yoshikami, D.* (1995) *Trends Biotechnol.*, **13**, 422–426.
51. *Conticello, S.G., Gilad, Y., Avidan, N., Ben-Asher, E., Levy, Z. Fainzilber, M.* (2001) *Mol. Biol. Evol.*, **18**, 120–131.
52. *Fry, B.G., Scheib, H., van der Weerd, L., Young, B., McNaughtan, J., Ramjan, S.F., Vidal, N., Poelmann, R.E., Norman, J.A.* (2008) *Mol. Cell. Proteomics*, **7**, 215–246.
53. *Fry, B.G. Wuster, W.* (2004) *Mol. Biol. Evol.*, **21**, 870–883.
54. *Wang, Y., Yap, L.L., Chua, K.L., Kho, H.E.* (2008) *Toxicon*, **51**, 1374–1382.
55. *Cavaliere, M., D'Urso, D., Lassa, A., Pierdominici, E., Robello, M., Grasso, A.* (1987) *Toxicon*, **25**, 965–974.
56. *Schiavo, G., Matteoli, M., Montecucco, C.* (2000) *Physiol. Rev.*, **80**, 717–766.
57. *Binford, G.J., Wells, M.A.* (2003) *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.*, **135**, 25–33.
58. *Bernheimer, A.W., Campbell, B.J., Forrester, L.J.* (1985) *Science*, **228**, 590–591.
59. *Bernheimer, A.W.* (1996) *Med. Microbiol. Immunol.*, **185**, 59–63.
60. *Habermann, E.* (1972) *Science*, **177**, 314–322.
61. *Koh, D.C., Armugam, A., Jeyaseelan, K.* (2006) *Cell. Mol. Life Sci.*, **63**, 3030–3041.
62. *Kozlov, S.A., Vassilevski, A.A., Feofanov, A.V., Surovoy, A.Y., Karpunin, D.V., Grishin, E.V.* (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 20983–20992.
63. *Vassilevski, A.A., Kozlov, S.A., Samsonova, O.V., Egorova, N.S., Karpunin, D.V., Pluzhnikov, K.A., Feofanov, A.V., Grishin, E.V.* (2008) *Biochem. J.*, **411**, 687–696.
64. *Argiolas, A., Pisano, J.J.* (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 10106–10111.
65. *Argiolas, A., Pisano, J.J.* (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 1437–1444.
66. *Orivel, J., Redeker, V., Le Caer, J.P., Krier, F., Revol-Junelles, A.M., Longeon, A., Chaffotte, A., Dejean, A., Rossier, J.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 17823–17829.

67. Raghuraman, H., Chattopadhyay, A. (2007) *Biosci. Rep.*, **27**, 189–223.
68. Mellor, I.R., Usherwood, P.N. (2004) *Toxicon*, **43**, 493–508.
69. Yan, L., Adams, M.E. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 2059–2066.
70. Budnik, B.A., Olsen, J.V., Egorov, T.A., Anisimova, V.E., Galkina, T.G., Musolyamov, A.K., Grishin, E.V. Zubarev, R.A. (2004) *J. Mass Spectrom.*, **39**, 193–201.
71. Corzo, G., Villegas, E., Gomez-Lagunas, F., Possani, L.D., Belokoneva, O.S., Nakajima, T. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 23627–23637.
72. Kuhn-Nentwig, L., Muller, J., Schaller, J., Walz, A., Dathe, M., Nentwig, W. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 11208–11216.
73. Quistad, G.B., Reuter, C.C., Skinner, W.S., Dennis, P.A., Suwanrumpha, S., Fu, E.W. (1991) *Toxicon*, **29**, 329–336.
74. Schanbacher, F.L., Lee, C.K., Hall, J.E., Wilson, I.B., Howell, D.E., Odell, G.V. (1973) *Toxicon*, **11**, 21–29.
75. Mebs, D. (2001) *Toxicon*, **39**, 87–96.
76. Adams, M.E., Herold, E.E., Venema, V.J. (1989) *J. Comp. Physiol. A*, **164**, 333–342.
77. Mintz, I.M., Venema, V.J., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Bean, B.P., Adams, M.E. (1992) *Nature*, **355**, 827–829.
78. Adams, M.E., Mintz, I.M., Reily, M.D., Thanabal, V., Bean, B.P. (1993) *Mol. Pharmacol.*, **44**, 681–688.
79. Meir, A., Ginsburg, S., Butkevich, A., Kachalsky, S.G., Kaiserman, I., Ahdut, R., Demirgoren, S., Rahamimoff, R. (1999) *Physiol. Rev.*, **79**, 1019–1088.
80. Wullschleger, B., Kuhn-Nentwig, L., Tromp, J., Kampfer, U., Schaller, J., Schurch, S. Nentwig, W. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 11251–11256.
81. Early, S.L., Michaelis, E.K. (1987) *Toxicon*, **25**, 433–442.
82. Terlau, H., Shon, K.J., Grilley, M., Stocker, M., Stuhmer, W. Olivera, B.M. (1996) *Nature*, **381**, 148–151.
83. Terlau, H., Olivera, B.M. (2004) *Physiol. Rev.*, **84**, 41–68.
84. Bindokas, V.P., Venema, V.J., Adams, M.E. (1991) *J. Neurophysiol.*, **66**, 590–601.
85. Kozlov, S.A., Grishin, E.V. (2007) *Toxicon*, **49**, 721–726.
86. Duda, T.F., Jr., Palumbi, S.R. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6820–6823.
87. Nakashima, K., Nobuhisa, I., Deshimaru, M., Nakai, M., Ogawa, T., Shimohigashi, Y., Fukumaki, Y., Hattori, M., Sakaki, Y., Hattori, S., Ohno, M. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 5605–5609.
88. Zhijian, C., Feng, L., Yingliang, W., Xin, M., Wenxin, L. (2006) *Toxicon*, **47**, 348–355.
89. Malli, H., Kuhn-Nentwig, L., Imboden, H., Moon, M.J. Wylter, T. (2000) *Cell Tissue Res.*, **299**, 417–426.
90. dos Santos, V.L., Franco, C.R., Viggiano, R.L., da Silveira, R.B., Cantao, M.P., Mangili, O.C., Veiga, S.S. Gremski, W. (2000) *Toxicon*, **38**, 265–285.
91. Yigit, N., Guven, T. (2006) *Toxicon*, **47**, 58–67.
92. Silva, L.M., Botelho, A.C., Nacif-Pimenta, R., Martins, G.F., Alves, L.C., Brayner, F.A., Fortes-Dias, C.L. Pimenta, P.F. (2008) *Toxicon*, **51**, 693–706.
93. Schroeder, F.C., Taggi, A.E., Gronquist, M., Malik, R.U., Grant, J.B., Eisner, T., Meinwald, J. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 14283–14287.
94. Kuhn-Nentwig, L., Schaller, J., Nentwig, W. (1994) *Toxicon*, **32**, 287–302.
95. Inceoglu, B., Lango, J., Jing, J., Chen, L., Doymaz, F., Pessah, I.N., Hammock, B.D. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 922–927.

96. *Welsh, J.H., Batty, C.S.* (1963) *Toxicol.*, **1**, 165–170.
97. *Rash, L.D., King, R.G., Hodgson, W.C.* (1998) *Toxicol.*, **36**, 367–375.
98. *Frew, R., Hamilton, M.G., Lundy, P.M.* (1994) *Toxicol.*, **32**, 511–515.
99. *Rash, L.D., King, R.G., Hodgson, W.C.* (2000) *Toxicol.*, **38**, 1111–1127.
100. *Duffield, P.H., Duffield, A.M., Carroll, P.R., Morgans, D.* (1979) *Biomed. Mass Spectrom.*, **6**, 105–108.
101. *Lange, C., Paris, C., Celerier, M.L.* (1992) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **6**, 289–292.
102. *Lange, C., Paris, C., Celerier, M.L.* (1992) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **6**, 517–519.
103. *Savel-Niemann, A.* (1989) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **370**, 485–498.
104. *Meinwald, J., Eisner, T.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 14–18.
105. *McCormick, J., Li, Y., McCormick, K., Duynstee, H.I., van Engen, A.K., van der Marel, G.A., Ganem, B., van Boom, J.H., Meinwald, J.* (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 5661–5665.
106. *Taggi, A.E., Meinwald, J., Schroeder, F.C.* (2004) *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 10364–10369.
107. *Horni, A., Weickmann, D., Hesse, M.* (2001) *Toxicol.*, **39**, 425–428.
108. *Chan, T.K., Geren, C.R., Howell, D.E., Odell, G.V.* (1975) *Toxicol.*, **13**, 61–66.
109. *Kawai, N., Niwa, A., Abe, T.* (1982) *Brain Res.*, **247**, 169–171.
110. *Усманов, П.Б., Каликулов, Д., Шадыева, Н., Ташмухамедов, Б.А.* (1983) Докл. Акад. наук СССР, **273**, 1017–1018.
111. *Usherwood, P.N., Duce, I.R., Boden, P.* (1984) *J. Physiol. (Paris)*, **79**, 241–245.
112. *Гришин Е.В., Волкова Т.М., Арсеньев А.С., Реуцетова О.С., Оноприенко В.В., Магазаник Л.Г., Антонов С.М., Федорова И.М.* (1986) Биоорган. химия, **12**, 1121–1124.
113. *Магазаник Л.Г., Антонов С.М., Федорова И.М., Волкова Т.М., Гришин Е.В.* (1986) Биологич. мембраны, **3**, 1204–1219.
114. *Antonov, S.M., Grishin, E.V., Magazanic, L.G., Shupliakov, O.V., Veselkin, N.P., Volkova, T.M.* (1987) *Neurosci. Lett.*, **83**, 179–184.
115. *Антонов С.М., Шупляков О.В., Магазаник Л.Г., Веселкин Н.П., Волкова Т.М., Гришин Е.В.* (1988) Докл. Акад. наук СССР, **298**, 505–508.
116. *Кискин Н.И., Крышталь О.А., Цындренко А.Я., Волкова Т.М., Гришин Е.В.* (1989) Нейрофизиология, **21**, 748–756.
117. *Гришин Е.В., Волкова Т.М., Арсеньев А.С.* (1988) Биоорган. химия, **14**, 883–892.
118. *Grishin, E.V., Volkova, T.M., Arseniev, A.S.* (1989) *Toxicol.*, **27**, 541–549.
119. *Grishin, E.V., Volkova, T.M., Arseniev, A.S.* (1989) *J. Protein. Chem.*, **8**, 320–322.
120. *Aramaki, Y., Yasuhara, T., Higashijima, T., Yoshioka, M., Miwa, A., Kawai, N., Nakajima, T.* (1986) *Proc. Japan Acad.*, **62B**, 359–362.
121. *Aramaki, Y., Yasuhara, T., Higashijima, T., Miwa, A., Kawai, N., Nakajima, T.* (1989) *Biomed. Res.*, **8**, 167–173.
122. *Рогоза Л.Н., Салахутдинов Н.Ф., Толстиков Г.А.* (2006) Биоорган. химия, **32**, 27–41.
123. *Norris, T.M., Moysa, E., Blagbrough, I.S., Adams, M.E.* (1996) *Mol. Pharmacol.*, **50**, 939–946.
124. *Tzouros, M., Chesnov, S., Bienz, S., Hesse, M., Bigler, L.* (2005) *Toxicol.*, **46**, 350–354.
125. *Hisada, M., Fujita, T., Naoki, H., Itagaki, Y., Irie, H., Miyashita, M., Nakajima, T.* (1998) *Toxicol.*, **36**, 1115–1125.

126. Cabbiness, S.G., Gehrke, C.W., Kuo, K.C., Chan, T.K., Hall, J.E., Hudiburg, S.A., Odell, G.V. (1980) *Toxicon*, **18**, 681–683.
127. Chesnov, S., Bigler, L., Hesse, M. (2001) *Helv. Chim. Acta*, **84**, 2178–2197.
128. Schroder, F.C., Farmer, J.J., Attygalle, A.B., Smedley, S.R., Eisner, T., Meinwald, J. (1998) *Science*, **281**, 428–431.
129. Eldefrawi, A.T., Eldefrawi, M.E., Konno, K., Mansour, N.A., Nakanishi, K., Oltz, E., Usherwood, P.N. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4910–4913.
130. Antonov, S.M., Dudel, J., Franke, C., Hatt, H. (1989) *J. Physiol.*, **419**, 569–587.
131. Williams, K. (1997) *Biochem. J.*, **325 (Pt 2)**, 289–297.
132. Tikhonov, D.B., Mellor, I.R., Usherwood, P.N. (2004) *Biophys. J.*, **87**, 159–170.
133. Kitaguchi, T., Swartz, K.J. (2005) *Biochemistry*, **44**, 15544–15549.
134. Yakehiro, M., Furukawa, Y., Koike, T., Kimura, E., Nakajima, T., Yamakoka, K., Seyama, I. (2001) *Br. J. Pharmacol.*, **132**, 63–72.
135. Lee, J.K., John, S.A., Weiss, J.N. (1999) *J. Gen. Physiol.*, **113**, 555–564.
136. Sutton, K.G., Stapleton, S.R., Scott, R.H. (1998) *Neurosci. Lett.*, **251**, 117–120.
137. Nakanishi, K., Choi, S.-K., Hwang, D., Lerro, K., Orlando, M., Kalivretenos, A.G., Eldefrawi, A., Eldefrawi, M., Usherwood, P.N.R. (1994) *Pure Appl. Chem.*, **66**, 671–678.
138. Stromgaard, K., Jensen, L.S., Vørgensen, S.B. (2005) *Toxicon*, **45**, 249–254.
139. Blaschke, M., Keller, B.U., Rivosecchi, R., Hollmann, M., Heinemann, S., Konnerth, A. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 6528–6532.
140. Gu, J.G., Albuquerque, C., Lee, C.J., MacDermott, A.B. (1996) *Nature*, **381**, 793–796.
141. Tikhonov, D.B., Mellor, J.R., Usherwood, P.N., Magazanik, L.G. (2002) *Biophys. J.*, **82**, 1884–1893.
142. Andersen, T.F., Tikhonov, D.B., Bolcho, U., Bolshakov, K., Nelson, J.K., Pluteanu, F., Mellor, I.R., Egebjerg, J., Stromgaard, K. (2006) *J. Med. Chem.*, **49**, 5414–5423.
143. Tikhonov, D.B. (2007) *Mol. Membr. Biol.*, **24**, 135–147.
144. Fenton, A.W., West, P.R., Odell, G.V., Hudiburg, S.M., Ownby, C.L., Mills, J.N., Scroggins, B.T., Shannon, S.B. (1995) *Toxicon*, **33**, 763–770.
145. Odell, G.V., Fenton, A.W., Ownby, C.L., Doss, M.P., Schmidt, J.O. (1999) *Toxicon*, **37**, 407–409.
146. Соснина Н.А., Голубенко З., Ахунов А.А., Кугаевская Е.В., Елисеева Ю.Е., Орехович В.Н. (1990) *Докл. Акад. наук СССР*, **315**, 236–239.
147. Ferreira, L.A., Alves, W.E., Lucas, M.S., Habermehl, G.G. (1996) *Toxicon*, **34**, 599–603.
148. Ferreira, L.A., Lucas, S.M., Alves, E.W., Hermann, V.V., Reichl, A.P., Habermehl, G., Zingali, R.B. (1998) *Toxicon*, **36**, 31–39.
149. Akchunov, A.A., Golubenko, Z., Sosnina, N. (1992) *Agents Actions Suppl.*, **38 (Pt 1)**, 469–474.
150. Schmidt, J.O. (1995) *Toxicon*, **33**, 917–927.
151. Cohen, E., Quistad, G.B. (1998) *Toxicon*, **36**, 353–358.
152. Kozlov, S.A., Vassilevski, A.A., Grishin, E.V. (2008) in "Peptidomics: methods and applications" (Soloviev, M., Shaw, C., Andr n, P., Eds.). Hoboken: John Wiley & Sons. pp. 55–70.
153. База данных полипептидных последовательностей UniProt (Universal Protein Resource): <http://www.uniprot.org>.

154. Василевский А.А. (2008). Цитолитические и антимикробные пептиды из яда паука *Lachesana tarabaevi*: Дисс. канд. хим. наук. М.: ИБХ РАН, 101 с.
155. База данных антимикробных пептидов APD (Antimicrobial Peptide Database): <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>.
156. Tossi, A., Sandri, L., Giangaspero, A. (2000) *Biopolymers*, **55**, 4–30.
157. Sitaram, N., Nagaraj, R. (2002) *Curr. Pharm. Des.*, **8**, 727–742.
158. Tossi, A., Sandri, L. (2002) *Curr. Pharm. Des.*, **8**, 743–761.
159. Yeaman, M.R., Yount, N.Y. (2003) *Pharmacol. Rev.*, **55**, 27–55.
160. Habermann, E., Jentsch, J. (1967) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **348**, 37–50.
161. Schiffer, M., Edmundson, A.B. (1967) *Biophys. J.*, **7**, 121–135.
162. База данных пространственных структур полипептидов PDB (Protein Data Bank): <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>.
163. Pukala, T.L., Boland, M.P., Gehman, J.D., Kuhn-Nentwig, L., Separovic, F., Bowie, J.H. (2007) *Biochemistry*, **46**, 3576–3585.
164. Dubovskii, P.V., Volynsky, P.E., Polyansky, A.A., Chupin, V.V., Efremov, R.G., Arseniev, A.S. (2006) *Biochemistry*, **45**, 10759–10767.
165. Dubovskii, P.V., Volynsky, P.E., Polyansky, A.A., Karpunin, D.V., Chupin, V.V., Efremov, R.G., Arseniev, A.S. (2008) *Biochemistry*, **47**, 3525–3533.
166. Efremov, R.G., Gulyaev, D.I., Vergoten, G., Modyanov, N.N. (1992) *J. Protein. Chem.*, **11**, 665–675.
167. Efremov, R.G., Alix, A.J. (1993) *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **11**, 483–507.
168. Василевский А.А., Козлов С.А., Жмак М.Н., Куделина И.А., Дубовский П.В., Шатурский О.Я., Арсеньев А.С., Гришин Е.В. (2007) *Биоорг. химия*, **33**, 405–412.
169. Belokoneva, O.S., Villegas, E., Corzo, G., Dai, L., Nakajima, T. (2003) *Biochim. Biophys. Acta*, **1617**, 22–30.
170. Belokoneva, O.S., Satake, H., Mal'tseva, E.L., Pal'mina, N.P., Villegas, E., Nakajima, T., Corzo, G. (2004) *Biochim. Biophys. Acta*, **1664**, 182–188.
171. Nomura, K., Corzo, G. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, **1758**, 1475–1482.
172. He, K., Ludtke, S.J., Worcester, D.L., Huang, H.W. (1996) *Biophys. J.*, **70**, 2659–2666.
173. Shai, Y. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1462**, 55–70.
174. Oren, Z., Shai, Y. (1998) *Biopolymers*, **47**, 451–463.
175. Pouny, Y., Rapaport, D., Mor, A., Nicolas, P., Shai, Y. (1992) *Biochemistry*, **31**, 12416–12423.
176. Ludtke, S.J., He, K., Heller, W.T., Harroun, T.A., Yang, L., Huang, H.W. (1996) *Biochemistry*, **35**, 13723–13728.
177. Yang, L., Harroun, T.A., Weiss, T.M., Ding, L., Huang, H.W. (2001) *Biophys. J.*, **81**, 1475–1485.
178. Bechinger, B., Lohner, K. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, **1758**, 1529–1539.
179. Giangaspero, A., Sandri, L., Tossi, A. (2001) *Eur. J. Biochem.*, **268**, 5589–5600.
180. Bleakman, A., Smyth, D.G. (1987) *Eur. J. Biochem.*, **167**, 161–165.
181. Pukala, T.L., Brinkworth, C.S., Carver, J.A., Bowie, J.H. (2004) *Biochemistry*, **43**, 937–944.
182. Kuhn-Nentwig, L., Dathe, M., Walz, A., Schaller, J., Nentwig, W. (2002) *FEBS Lett.*, **527**, 193–198.
183. Suchyna, T.M., Johnson, J.H., Hamer, K., Leykam, J.F., Gage, D.A.,

- Clemo, H.F., Baumgarten, C.M., Sachs, F. (2000) *J. Gen. Physiol.*, **115**, 583–598.
184. Jung, H.J., Kim, P.I., Lee, S.K., Lee, C.W., Eu, Y.J., Lee, D.G., Earm, Y.E., Kim, J.I. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **340**, 633–638.
185. Oswald, R.E., Suchyna, T.M., McFeeters, R., Gottlieb, P., Sachs, F. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 34443–34450.
186. Craik, D.J., Daly, N.L., Mulvenna, J., Plan, M.R., Trabi, M. (2004) *Curr. Protein Pept. Sci.*, **5**, 297–315.
187. Bulet, P., Stocklin, R. (2005) *Protein Pept. Lett.*, **12**, 3–11.
188. Gimenez-Gallego, G., Navia, M.A., Reuben, J.P., Katz, G.M., Kaczorowski, G.J., Garcia, M.L. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 3329–3333.
189. Yount, N.Y., Yeaman, M.R. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 7363–7368.
190. Lee, S.Y., MacKinnon, R. (2004) *Nature*, **430**, 232–235.
191. Conde, R., Zamudio, F.Z., Rodriguez, M.H., Possani, L.D. (2000) *FEBS Lett.*, **471**, 165–168.
192. Diego-Garcia, E., Schwartz, E.F., D'Suze, G., Gonzalez, S.A., Batista, C.V., Garcia, B.I., de la Vega, R.C., Possani, L.D. (2007) *Peptides*, **28**, 31–37.
193. Brogden, K.A. (2005) *Nat. Rev. Microbiol.*, **3**, 238–250.
194. Brown, K.L., Hancock, R.E. (2006) *Curr. Opin. Immunol.*, **18**, 24–30.
195. Zasloff, M. (2002) *Nature*, **415**, 389–395.
196. Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. (2005) *Nat. Rev. Microbiol.*, **3**, 777–788.
197. Torres-Larios, A., Gurrola, G.B., Zamudio, F.Z., Possani, L.D. (2000) *Eur. J. Biochem.*, **267**, 5023–5031.
198. Moerman, L., Bosteels, S., Noppe, W., Willems, J., Clynen, E., Schoofs, L., Thevissen, K., Tytgat, J., Van Eldere, J., Van Der Walt, J., Verdonck, F. (2002) *Eur. J. Biochem.*, **269**, 4799–4810.
199. Dai, L., Corzo, G., Naoki, H., Andriantsiferana, M., Nakajima, T. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **293**, 1514–1522.
200. Каталог видового разнообразия пауков. The World Spider Catalog, Version 9.5 by Norman I. Platnick, American Museum of Natural History: <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>.
201. База данных о систематике и географическом распространении пауков России и стран бывшего СССР создана К.Г. Михайловым (Зоологический музей МГУ, Москва) на основе «Каталога пауков (Arachnida, Aranei) территорий бывшего Советского Союза» (1997): <http://www.zin.ru/BioDiv/aranei.asp>.
202. Pan, Z., Barry, R., Lipkin, A., Soloviev, M. (2007) *BMC Mol. Biol.*, **8**, 32.
203. Jiang, L., Peng, L., Chen, J., Zhang, Y., Xiong, X., Liang, S. (2008) *Toxicon*, **51**, 1479–1489.
204. Olivera, B.M., Cruz, L.J. (2001) *Toxicon*, **39**, 7–14.
205. Miller, C. (1995) *Neuron*, **15**, 5–10.
206. Tytgat, J., Chandy, K.G., Garcia, M.L., Gutman, G.A., Martin-Eauc-laire, M.F., van der Walt, J.J., Possani, L.D. (1999) *Trends Pharmacol. Sci.*, **20**, 444–447.
207. King, G.F., Gentz, M.C., Escoubas, P., Nicholson, G.M. (2008) *Toxicon*, **52**, 264–276.
208. Buczek, O., Bulaj, G., Olivera, B.M. (2005) *Cell. Mol. Life Sci.*, **62**, 3067–3079.
209. Branton, W.D., Rudnick, M.S., Zhou, Y., Eccleston, E.D., Fields, G.B., Bowers, L.D. (1993) *Nature*, **365**, 496–497.

210. Heck, S.D., Siok, C.J., Krapcho, K.J., Kelbaugh, P.R., Thadeio, P.F., Welch, M.J., Williams, R.D., Ganong, A.H., Kelly, M.E., Lanzetti, A.J., Gray, W.R., Phillips, D., Parks, T.N., Jackson, H., Ahlijanian, M.K., Saccomano, N.A., Volkmann, R.A. (1994) *Science*, **266**, 1065–1068.
211. Kuwada, M., Teramoto, T., Kumagaya, K.Y., Nakajima, K., Watanabe, T., Kawai, T., Kawakami, Y., Niidome, T., Sawada, K., Nishizawa, Y., Kouichi, K. (1994) *Mol. Pharmacol.*, **46**, 587–593.
212. Santos, A.D., Imperial, J.S., Chaudhary, T., Beavis, R.C., Chait, B.T., Hunsperger, J.P., Olivera, B.M., Adams, M.E., Hillyard, D.R. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 20701–20705.
213. Skerra, A. (2000) *J. Mol. Recognit.*, **13**, 167–187.
214. Hosse, R.J., Rothe, A., Power, B.E. (2006) *Protein Sci.*, **15**, 14–27.
215. Jimenez-Barbero, J., Javier Canada, F., Asensio, J.L., Aboitiz, N., Vidal, P., Canales, A., Groves, P., Gabius, H.J., Siebert, H.C. (2006) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **60**, 303–354.
216. Fletcher, J.I., Chapman, B.E., Mackay, J.P., Howden, M.E., King, G.F. (1997) *Structure*, **5**, 1525–1535.
217. Pallaghy, P.K., Alewood, D., Alewood, P.F., Norton, R.S. (1997) *FEBS Lett.*, **419**, 191–196.
218. Wang, X., Connor, M., Smith, R., Maciejewski, M.W., Howden, M.E., Nicholson, G.M., Christie, M.J., King, G.F. (2000) *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 505–513.
219. Shu, Q., Lu, S.Y., Gu, X.C., Liang, S.P. (2002) *Protein Sci.*, **11**, 245–252.
220. Wen, S., Wilson, D.T., Kuruppu, S., Korsinczky, M.L., Hedrick, J., Pang, L., Szeto, T., Hodgson, W.C., Alewood, P.F., Nicholson, G.M. (2005) *Peptides*, **26**, 2412–2426.
221. Peng, K., Lin, Y., Liang, S.P. (2006) *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, **38**, 457–466.
222. Berndt, K.D., Guntert, P., Orbons, L.P., Wuthrich, K. (1992) *J. Mol. Biol.*, **227**, 757–775.
223. Antuch, W., Berndt, K.D., Chavez, M.A., Delfin, J., Wuthrich, K. (1993) *Eur. J. Biochem.*, **212**, 675–684.
224. Harvey, A.L. (2001) *Toxicon*, **39**, 15–26.
225. Schweitz, H., Bruhn, T., Guillemare, E., Moinier, D., Lancelin, J.M., Beress, L., Lazdunski, M. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 25121–25126.
226. Andreev, Y.A., Kozlov, S.A., Koshelev, S.G., Ivanova, E.A., Monastyrnaya, M.M., Kozlovskaya, E.P., Grishin, E.V. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 23914–23921.
227. Adams, M.E., Bindokas, V.P., Hasegawa, L., Venema, V.J. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 861–867.
228. Swartz, K.J., MacKinnon, R. (1995) *Neuron*, **15**, 941–949.
229. Peng, K., Shu, Q., Liu, Z., Liang, S. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 47564–47571.
230. Martin-Moutot, N., Mansuelle, P., Alcaraz, G., Dos Santos, R.G., Cordeiro, M.N., De Lima, M.E., Seagar, M., Van Renterghem, C. (2006) *Mol. Pharmacol.*, **69**, 1931–1937.
231. Li, R.A., Tomaselli, G.F. (2004) *Toxicon*, **44**, 117–122.
232. French, R.J., Terlau, H. (2004) *Curr. Med. Chem.*, **11**, 3053–3064.
233. Billen, B., Bosmans, F., Tytgat, J. (2008) *Curr. Pharm. Des.*, **14**, 2492–2502.
234. Mouhat, S., De Waard, M., Sabatier, J.M. (2005) *J. Pept. Sci.*, **11**, 65–68.
235. Mintz, I.M. (1994) *J. Neurosci.*, **14**, 2844–2853.
236. Swartz, K.J., MacKinnon, R. (1997) *Neuron*, **18**, 665–673.

237. Swartz, K.J., MacKinnon, R. (1997) *Neuron*, **18**, 675–682.
238. Li-Smerin, Y., Swartz, K.J. (2000) *J. Gen. Physiol.*, **115**, 673–684.
239. Lampe, R.A., Defeo, P.A., Davison, M.D., Young, J., Herman, J.L., Spreng, R.C., Horn, M.B., Mangano, T.J., Keith, R.A. (1993) *Mol. Pharmacol.*, **44**, 451–460.
240. McDonough, S.I., Lampe, R.A., Keith, R.A., Bean, B.P. (1997) *Mol. Pharmacol.*, **52**, 1095–1104.
241. Middleton, R.E., Warren, V.A., Kraus, R.L., Hwang, J.C., Liu, C.J., Dai, G., Brochu, R.M., Kohler, M.G., Gao, Y.D., Garsky, V.M., Bogusky, M.J., Mehl, J.T., Cohen, C.J., Smith, M.M. (2002) *Biochemistry*, **41**, 14734–14747.
242. Priest, B.T., Blumenthal, K.M., Smith, J.J., Warren, V.A., Smith, M.M. (2007) *Toxicon*, **49**, 194–201.
243. Li-Smerin, Y., Swartz, K.J. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 8585–8589.
244. Smith, J.J., Cummins, T.R., Alphy, S., Blumenthal, K.M. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 12687–12697.
245. Milescu, M., Vobecky, J., Roh, S.H., Kim, S.H., Jung, H.J., Kim, J.I., Swartz, K.J. (2007) *J. Gen. Physiol.*, **130**, 497–511.
246. Alabi, A.A., Bahamonde, M.I., Jung, H.J., Kim, J.I., Swartz, K.J. (2007) *Nature*, **450**, 370–375.
247. Bosmans, F., Martin-Eauclaire, M.F., Swartz, K.J. (2008) *Nature*, **456**, 202–208.
248. Swartz, K.J. (2008) *Nature*, **456**, 891–897.
249. Catterall, W.A., Cestele, S., Yarov-Yarovoy, V., Yu, F.H., Konoki, K., Scheuer, T. (2007) *Toxicon*, **49**, 124–141.
250. Possani, L.D., Becerril, B., Delepierre, M., Tytgat, J. (1999) *Eur. J. Biochem.*, **264**, 287–300.
251. Little, M.J., Wilson, H., Zappia, C., Cestele, S., Tyler, M.I., Martin-Eauclaire, M.F., Gordon, D., Nicholson, G.M. (1998) *FEBS Lett.*, **439**, 246–252.
252. Nicholson, G.M., Little, M.J., Birinyi-Strachan, L.C. (2004) *Toxicon*, **43**, 587–599.
253. Sheumack, D.D., Claassens, R., Whiteley, N.M., Howden, M.E. (1985) *FEBS Lett.*, **181**, 154–156.
254. Brown, M.R., Sheumack, D.D., Tyler, M.I., Howden, M.E. (1988) *Biochem. J.*, **250**, 401–405.
255. Nicholson, G.M., Willow, M., Howden, M.E., Narahashi, T. (1994) *Pflugers Arch.*, **428**, 400–409.
256. Nicholson, G.M., Walsh, R., Little, M.J., Tyler, M.I. (1998) *Pflugers Arch.*, **436**, 117–126.
257. Cordeiro Mdo, N., Diniz, C.R., Valentim Ado, C., von Eickstedt, V.R., Gilroy, J., Richardson, M. (1992) *FEBS Lett.*, **310**, 153–156.
258. Matavel, A., Cruz, J.S., Penaforte, C.L., Araujo, D.A., Kalapothakis, E., Prado, V.F., Diniz, C.R., Cordeiro, M.N., Beirao, P.S. (2002) *FEBS Lett.*, **523**, 219–223.
259. Figueiredo, S.G., Garcia, M.E., Valentim, A.C., Cordeiro, M.N., Diniz, C.R., Richardson, M. (1995) *Toxicon*, **33**, 83–93.
260. de Lima, M.E., Stankiewicz, M., Hamon, A., de Figueiredo, S.G., Cordeiro, M.N., Diniz, C.R., Martin-Eauclaire, M., Pelhate, M. (2002) *J. Insect Physiol.*, **48**, 53–61.
261. Isbister, G.K., Graudins, A., White, J., Warrell, D. (2003) *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, **41**, 291–300.
262. Skinner, W.S., Adams, M.E., Quistad, G.B., Kataoka, H., Cesarin, B.J., Enderlin, F.E., Schooley, D.A. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 2150–2155.
263. Corzo, G., Escoubas, P., Stankiewicz, M., Pelhate, M., Kristensen, C.P., Nakajima, T. (2000) *Eur. J. Biochem.*, **267**, 5783–5795.

264. Corzo, G., Escoubas, P., Villegas, E., Karbat, I., Gordon, D., Gurevitz, M., Nakajima, T., Gilles, N. (2005) *Biochemistry*, **44**, 1542–1549.
265. Tsetlin, V.I., Hucho, F. (2004) *FEBS Lett.*, **557**, 9–13.
266. Suchyna, T.M., Tape, S.E., Koeppe, R.E., 2nd, Andersen, O.S., Sachs, F., Gottlieb, P.A. (2004) *Nature*, **430**, 235–240.
267. Smith, J.J., Alphy, S., Seibert, A.L., Blumenthal, K.M. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 11127–11133.
268. Jung, H.J., Lee, J.Y., Kim, S.H., Eu, Y.J., Shin, S.Y., Milesco, M., Swartz, K.J., Kim, J.I. (2005) *Biochemistry*, **44**, 6015–6023.
269. Posokhov, Y.O., Gottlieb, P.A., Morales, M.J., Sachs, F., Ladokhin, A.S. (2007) *Biophys. J.*, **93**, L20–22.
270. Wee, C.L., Bemporad, D., Sands, Z.A., Gavaghan, D., Sansom, M.S. (2007) *Biophys. J.*, **92**, L07–L09.
271. Wang, S.Y., Wang, G.K. (2003) *Cell. Signal.*, **15**, 151–159.
272. Norton, R.S., McDonough, S.I. (2008) *Curr. Pharm. Des.*, **14**, 2480–2491.
273. McDonough, S.I. (2007) *Toxicon*, **49**, 202–212.
274. Bindokas, V.P., Adams, M.E. (1989) *J. Neurobiol.*, **20**, 171–188.
275. Scott, R.H., Dolphin, A.C., Bindokas, V.P., Adams, M.E. (1990) *Mol. Pharmacol.*, **38**, 711–718.
276. Venema, V.J., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Hathaway, G.M., Adams, M.E. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 2610–2615.
277. Yan, L., Adams, M.E. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 21309–21316.
278. Sather, W.A., Tanabe, T., Zhang, J.F., Tsien, R.W. (1994) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **747**, 294–301.
279. Sidach, S.S., Mintz, I.M. (2000) *J. Neurosci.*, **20**, 7174–7182.
280. Kalapothakis, E., Penaforte, C.L., Leao, R.M., Cruz, J.S., Prado, V.F., Cordeiro, M.N., Diniz, C.R., Romano-Silva, M.A., Prado, M.A., Gomez, M.V., Beirao, P.S. (1998) *Toxicon*, **36**, 1971–1980.
281. dos Santos, R.G., Van Renterghem, C., Martin-Moutot, N., Mansuelle, P., Cordeiro, M.N., Diniz, C.R., Mori, Y., De Lima, M.E., Seagar, M. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 13856–13862.
282. Leao, R.M., Cruz, J.S., Diniz, C.R., Cordeiro, M.N., Beirao, P.S. (2000) *Neuropharmacology*, **39**, 1756–1767.
283. Vieira, L.B., Kushmerick, C., Hildebrand, M.E., Garcia, E., Stea, A., Cordeiro, M.N., Richardson, M., Gomez, M.V., Snutch, T.P. (2005) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **314**, 1370–1377.
284. Fletcher, J.I., Smith, R., O'Donoghue, S.I., Nilges, M., Connor, M., Howden, M.E., Christie, M.J., King, G.F. (1997) *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 559–566.
285. Wang, X.H., Connor, M., Wilson, D., Wilson, H.I., Nicholson, G.M., Smith, R., Shaw, D., Mackay, J.P., Alewood, P.F., Christie, M.J., King, G.F. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 40306–40312.
286. Bloomquist, J.R. (2003) *Invert. Neurosci.*, **5**, 45–50.
287. Chong, Y., Hayes, J.L., Sollod, B., Wen, S., Wilson, D.T., Hains, P.G., Hodgson, W.C., Broady, K.W., King, G.F., Nicholson, G.M. (2007) *Biochem. Pharmacol.*, **74**, 623–638.
288. Escoubas, P., De Weille, J.R., Le-coq, A., Diocot, S., Waldmann, R., Champigny, G., Moinier, D., Menez, A., Lazdunski, M. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 25116–25121.
289. Siemens, J., Zhou, S., Piskorowski, R., Nikai, T., Lumpkin, E.A., Basbaum, A.I., King, D., Julius, D. (2006) *Nature*, **444**, 208–212.
290. Liang, S.P., Pan, X. (1995) *Toxicon*, **33**, 875–882.
291. Lu, S., Liang, S., Gu, X. (1999) *J. Protein. Chem.*, **18**, 609–617.

292. Choi, S.J., Parent, R., Guillaume, C., Deregnacourt, C., Delarbre, C., Ojcius, D.M., Montagne, J.J., Celerier, M.L., Phelipot, A., Amiche, M., Molgo, J., Camadro, J.M., Guette, C. (2004) *FEBS Lett.*, **572**, 109–117.
293. Pimentel, C., Choi, S.J., Chagot, B., Guette, C., Camadro, J.M., Darbon, H. (2006) *Protein Sci.*, **15**, 628–634.
294. Reis, H.J., Prado, M.A., Kalapothakis, E., Cordeiro, M.N., Diniz, C.R., De Marco, L.A., Gomez, M.V., Romano-Silva, M.A. (1999) *Biochem. J.*, **343** (Pt 2), 413–418.
295. Reis, H.J., Gomez, M.V., Kalapothakis, E., Diniz, C.R., Cordeiro, M.N., Prado, M.A., Romano-Silva, M.A. (2000) *Neuroreport*, **11**, 2191–2194.
296. Duan, Z.G., Yan, X.J., He, X.Z., Zhou, H., Chen, P., Cao, R., Xiong, J.X., Hu, W.J., Wang, X.C., Liang, S.P. (2006) *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.*, **145**, 350–357.
297. Richardson, M., Pimenta, A.M., Bemquerer, M.P., Santoro, M.M., Beirao, P.S., Lima, M.E., Figueiredo, S.G., Bloch, C., Jr., Vasconcelos, E.A., Campos, F.A., Gomes, P.C., Cordeiro, M.N. (2006) *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.*, **142**, 173–187.
298. Chen, J., Zhao, L., Jiang, L., Meng, E., Zhang, Y., Xiong, X., Liang, S. (2008) *Toxicon*, **52**, 794–806.
299. Fernandes-Pedrosa Mde, F., Junqueira-de-Azevedo Ide, L., Goncalves-de-Andrade, R.M., Kobashi, L.S., Almeida, D.D., Ho, P.L., Tambourgi, D.V. (2008) *BMC Genomics*, **9**, 279.
300. Perret, B.A. (1977) *Toxicon*, **15**, 505–510.
301. Norment, B.R., Jong, Y.S., Heitz, J.R. (1979) *Toxicon*, **17**, 539–548.
302. Atkinson, R.K., Wright, L.G. (1992) *Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, **102**, 125–128.
303. Akhunov, A.A., Makevnina, L.G., Golubenko, Z., Paskhina, T.S. (1996) *Immunopharmacology*, **32**, 160–162.
304. Feitosa, L., Gremski, W., Veiga, S.S., Elias, M.C., Graner, E., Mangili, O.C., Brentani, R.R. (1998) *Toxicon*, **36**, 1039–1051.
305. Veiga, S.S., da Silveira, R.B., Dreyfus, J.L., Haoach, J., Pereira, A.M., Mangili, O.C., Gremski, W. (2000) *Toxicon*, **38**, 825–839.
306. Young, A.R., Pincus, S.J. (2001) *Toxicon*, **39**, 391–400.
307. da Silveira, R.B., dos Santos Filho, J.F., Mangili, O.C., Veiga, S.S., Gremski, W., Nader, H.B., von Dietrich, C.P. (2002) *Toxicon*, **40**, 815–822.
308. Barbaro, K.C., Knysak, I., Martins, R., Hogan, C., Winkel, K. (2005) *Toxicon*, **45**, 489–499.
309. da Silveira, R.B., Wille, A.C., Chaim, O.M., Appel, M.H., Silva, D.T., Franco, C.R., Toma, L., Mangili, O.C., Gremski, W., Dietrich, C.P., Nader, H.B., Veiga, S.S. (2007) *Biochem. J.*, **406**, 355–363.
310. Devaraja, S., Nagaraju, S., Mahadeswaraswamy, Y.H., Girish, K.S., Kemparaju, K. (2008) *Toxicon*, **52**, 130–138.
311. Schanbacher, F.L., Lee, C.K., Wilson, I.B., Howell, D.E., Odell, G.V. (1973) *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.*, **44**, 389–396.
312. Nagaraju, S., Mahadeswaraswamy, Y.H., Girish, K.S., Kemparaju, K. (2006) *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.*, **144**, 1–9.
313. Kreil, G. (1995) *Protein Sci.*, **4**, 1666–1669.
314. Usmanov, P.B., Nuritova, F.A. (1994) *Toxicon*, **32**, 625–628.
315. Shikata, Y., Watanabe, T., Teramoto, T., Inoue, A., Kawakami, Y., Nishizawa, Y., Katayama, K., Kuwada, M. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 16719–16723.

316. Jilek, A., Mollay, C., Tippelt, C., Grassi, J., Mignogna, G., Mullegger, J., Sander, V., Fehrer, C., Barra, D., Kreil, G. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **102**, 4235–4239.
317. Heck, S.D., Faraci, W.S., Kelbaugh, P.R., Saccomano, N.A., Thadeio, P. F., Volkmann, R.A. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**, 4036–4039.
318. Bansal, P.S., Torres, A.M., Crossett, B., Wong, K.K., Koh, J.M., Geraghty, D.P., Vandenberg, J.I., Kuchel, P.W. (2008) J. Biol. Chem., **283**, 8969–8975.
319. Ramos-Cerrillo, B., Olvera, A., Odell, G.V., Zamudio, F., Paniagua-Solis, J., Alagon, A., Stock, R.P. (2004) Toxicol., **44**, 507–514.
320. Futrell, J.M. (1992) Am. J. Med. Sci., **304**, 261–267.
321. Mota, I., Barbaro, K.C. (1995) J. Toxicol. Tox. Rev., **14**, 401–421.
322. Babcock, J.L., Civello, D.J., Geren, C.R. (1981) Toxicol., **19**, 677–689.
323. Kurpiewski, G., Forrester, L.J., Barrett, J.T., Campbell, B.J. (1981) Biochim. Biophys. Acta, **678**, 467–476.
324. Lee, S., Lynch, K.R. (2005) Biochem. J., **391**, 317–323.
325. Murakami, M.T., Fernandes-Pedrosa, M.F., Tambourgi, D.V., Arni, R.K. (2005) J. Biol. Chem., **280**, 13658–13664.
326. Machado, L.F., Laugesen, S., Botelho, E.D., Ricart, C.A., Fontes, W., Barbaro, K.C., Roepstorff, P., Sousa, M.V. (2005) Proteomics, **5**, 2167–2176.
327. Braz, A., Minozzo, J., Abreu, J.C., Gubert, I.C., Chavez-Olortegui, C. (1999) Toxicol., **37**, 1323–1328.
328. Fernandes Pedrosa Mde, F., Junqueira de Azevedo Ide, L., Goncalves-de-Andrade, R.M., van den Berg, C.W., Ramos, C.R., Ho, P.L., Tambourgi, D.V. (2002) Biochem. Biophys. Res. Commun., **298**, 638–645.
329. Tambourgi, D.V., de, F.F.P.M., van den Berg, C.W., Goncalves-de-Andrade, R.M., Ferracini, M., Paixao-Cavalcante, D., Morgan, B.P., Rushmere, N.K. (2004) Mol. Immunol., **41**, 831–840.
330. Binford, G.J., Cordes, M.H., Wells, M.A. (2005) Toxicol., **45**, 547–560.
331. Pauli, I., Puka, J., Gubert, I.C., Minozzo, J.C. (2006) Toxicol., **48**, 123–137.
332. Ribeiro, R.O., Chaim, O.M., da Silveira, R.B., Gremski, L.H., Sade, Y.B., Paludo, K.S., Senff-Ribeiro, A., de Moura, J., Chavez-Olortegui, C., Gremski, W., Nader, H.B., Veiga, S.S. (2007) Toxicol., **50**, 1162–1174.
333. Appel, M.H., da Silveira, R.B., Chaim, O.M., Paludo, K.S., Silva, D.T., Chaves, D.M., da Silva, P.H., Mangili, O.C., Senff-Ribeiro, A., Gremski, W., Nader, H.B., Veiga, S.S. (2008) Biochim. Biophys. Acta, **1780**, 167–178.
334. Senff-Ribeiro, A., Henrique da Silva, P., Chaim, O.M., Gremski, L.H., Paludo, K.S., Bertoni da Silveira, R., Gremski, W., Mangili, O.C., Veiga, S.S. (2008) Biotechnol. Adv., **26**, 210–218.
335. Binford, G.J., Bodner, M.R., Cordes, M.H., Baldwin, K.L., Rynerson, M.R., Burns, S.N., Zobel-Thropp, P.A. (2009) Mol. Biol. Evol., **26**, 547–566.
336. Cordes, M.H., Binford, G.J. (2006) Bioinformatics, **22**, 264–268.
337. Morgan, P.N. (1969) Toxicol., **6**, 161–165.
338. Rees, R.S., Gates, C., Timmons, S., Des Prez, R.M., King, L.E., Jr. (1988) Toxicol., **26**, 1035–1045.
339. Tambourgi, D.V., Pedrosa, M.F., de Andrade, R.M., Billington, S.J., Griffiths, M., van den Berg, C.W. (2007) Mol. Immunol., **44**, 576–582.
340. Tambourgi, D.V., Paixao-Cavalcante, D., Goncalves de Andrade,

- R.M., Fernandes-Pedrosa Mde, F., Magnoli, F.C., Paul Morgan, B., van den Berg, C.W. (2005) *J. Invest. Dermatol.*, **124**, 725–731.
341. Tambourgi, D.V., De Sousa Da Silva, M., Billington, S.J., Goncalves De Andrade, R.M., Magnoli, F.C., Songer, J.G., Van Den Berg, C.W. (2002) *Immunology*, **107**, 93–101.
342. Ramu, Y., Xu, Y., Lu, Z. (2006) *Nature*, **442**, 696–699.
343. Longenecker, H.E., Jr., Hurlbut, W.P., Mauro, A., Clark, A.W. (1970) *Nature*, **225**, 701–703.
344. Frontali, N., Ceccarelli, B., Gorio, A., Mauro, A., Siekevitz, P., Tzeng, M.C., Hurlbut, W.P. (1976) *J. Cell. Biol.*, **68**, 462–479.
345. Graudins, A., Gunja, N., Broady, K.W., Nicholson, G.M. (2002) *Toxicol.*, **40**, 767–775.
346. Rosenthal, L., Meldolesi, J. (1989) *Pharmacol. Ther.*, **42**, 115–134.
347. Mislner, S., Hurlbut, W.P. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 991–995.
348. Storchak, L.G., Pashkov, V.N., Pozdnyakova, N.G., Himmelreich, N.H., Grishin, E.V. (1994) *FEBS Lett.*, **351**, 267–270.
349. Fritz, L.C., Tzen, M.C., Mauro, A. (1980) *Nature*, **283**, 486–487.
350. Grishin, E. (1994) *Pure Appl. Chem.*, **66**, 783–790.
351. Ковалевская Г.И., Пашков В.Н., Булгаков О.В., Федорова И.М., Магазаник Л.Г., Гришин Е.В. (1990) *Биоорган. химия*, **16**, 1013–1018.
352. Красноперов В.Г., Шамотиенко О.Г., Гришин Е.В. (1990) *Биоорган. химия*, **16**, 1138–1140.
353. Красноперов В.Г., Шамотиенко О.Г., Гришин Е.В. (1990) *Биоорган. химия*, **16**, 1567–1569.
354. Magazanik, L.G., Fedorova, I.M., Kovalevskaya, G.I., Pashkov, V.N., Bulgakov, O.V., Grishin, E.V. (1992) *Neuroscience*, **46**, 181–188.
355. Finkelstein, A., Rubin, L.L., Tzeng, M.C. (1976) *Science*, **193**, 1009–1011.
356. Shatursky, O., Pashkov, V.N., Bulgakov, O.V., Grishin, E.V. (1995) *Biochim. Biophys. Acta*, **1233**, 14–20.
357. Kiyatkin, N.I., Dulubova, I.E., Chekhovskaya, I.A., Grishin, E.V. (1990) *FEBS Lett.*, **270**, 127–131.
358. Kiyatkin, N., Dulubova, I., Grishin, E. (1993) *Eur. J. Biochem.*, **213**, 121–127.
359. Dulubova, I.E., Krasnoperov, V.G., Khvotchev, M.V., Pluzhnikov, K.A., Volkova, T.M., Grishin, E.V., Vais, H., Bell, D.R., Usherwood, P.N. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 7535–7543.
360. Данилевич В.Н., Лукьянов С.А., Гришин Е.В. (1999) *Биоорган. химия*, **25**, 537–547.
361. Воронин Д.А., Киселева Е.В. (2007) *Цитология*, **49**, 989–999.
362. Li, J., Mahajan, A., Tsai, M.D. (2006) *Biochemistry*, **45**, 15168–15178.
363. Кияткин Н., Дулубова И.Е., Волкова Т.М., Чеховская И.А., Липкин А.В., Гришин Е.В. (1992) *Докл. Акад. наук СССР*, **323**, 178–180.
364. Kiyatkin, N., Dulubova, I., Chekhovskaya, I., Lipkin, A., Grishin, E. (1992) *Toxicol.*, **30**, 771–774.
365. Volkova, T.M., Pluzhnikov, K.A., Woll, P.G., Grishin, E.V. (1995) *Toxicol.*, **33**, 483–489.
366. Gasparini, S., Kiyatkin, N., Drevet, P., Boulain, J.C., Tacnet, F., Ripoch, P., Forest, E., Grishin, E., Menez, A. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 19803–19809.
367. Kiyatkin, N.I., Kulikovskaya, I.M., Grishin, E.V., Beadle, D.J., King, L.A. (1995) *Eur. J. Biochem.*, **230**, 854–859.
368. Лунев А.В., Демин В.В., Зайцев О.И., Спандар С.И., Гришин Е.В. (1991) *Биоорган. химия*, **17**, 1021–1026.

369. Orlova, E.V., Rahman, M.A., Gowen, B., Volynski, K.E., Ashton, A.C., Manser, C., van Heel, M., Ushkaryov, Y.A. (2000) *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 48–53.
370. Ashton, A.C., Rahman, M.A., Volynski, K.E., Manser, C., Orlova, E.V., Matsushita, H., Davletov, B.A., van Heel, M., Grishin, E.V., Ushkaryov, Y.A. (2000) *Biochimie*, **82**, 453–468.
371. Petrenko, A.G., Kovalenko, V.A., Shamotienko, O.G., Surkova, I.N., Tarasyuk, T.A., Ushkaryov, Yu.A., Grishin, E.V. (1990) *EMBO J.*, **9**, 2023–2027.
372. Surkova, I.N., Grishin, E.V. (1991) *Biomed. Sci.*, **2**, 417–420.
373. O'Connor, V.M., Shamotienko, O., Grishin, E., Betz, H. (1993) *FEBS Lett.*, **326**, 255–260.
374. Ushkaryov, Y.A., Petrenko, A.G., Geppert, M., Sudhof, T.C. (1992) *Science*, **257**, 50–56.
375. Davletov, B.A., Shamotienko, O.G., Lelianova, V.G., Grishin, E.V., Ushkaryov, Y.A. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 23239–23245.
376. Lelianova, V.G., Davletov, B.A., Sterling, A., Rahman, M.A., Grishin, E.V., Totty, N.F., Ushkaryov, Y.A. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 21504–21508.
377. Krasnoperov, V.G., Beavis, R., Chepurny, O.G., Little, A.R., Plotnikov, A.N., Petrenko, A.G. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **227**, 868–875.
378. Krasnoperov, V., Bittner, M.A., Mo, W., Buryanovsky, L., Neubert, T.A., Holz, R.W., Ichtchenko, K., Petrenko, A.G. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 35887–35895.
379. Liu, J., Wan, Q., Lin, X., Zhu, H., Volynski, K., Ushkaryov, Y., Xu, T. (2005) *Traffic*, **6**, 756–765.
380. Ushkaryov, Y.A., Rohou, A., Sugita, S. (2008) *Handb. Exp. Pharmacol.*, **184**, 171–206.
381. Андреев Я.А., Данилевич В.Н., Гришин Е.В. (2005) *Биоорганическая химия*, **31**, 175–185.
382. Mee, C.J., Tomlinson, S.R., Perestenko, P.V., De Pomerai, D., Duce, I.R., Usherwood, P.N., Bell, D.R. (2004) *Biochem. J.*, **378**, 185–191.
383. Ushkaryov, Y.A., Volynski, K.E., Ashton, A.C. (2004) *Toxicon*, **43**, 527–542.
384. Krapcho, K.J., Kral, R.M., Jr., Vanwagenen, B.C., Eppler, K.G., Morgan, T.K. (1995) *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **25**, 991–1000.
385. Qiao, P., Zuo, X.P., Chai, Z.F., Ji, Y.H. (2004) *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, **36**, 656–660.
386. Jiang, L., Chen, J., Peng, L., Zhang, Y., Xiong, X., Liang, S. (2008) *Peptides*, **29**, 1679–1684.
387. Данилевич В.Н., Гришин Е.В. (2000) *Биоорганическая химия*, **26**, 933–939.
388. Shlyapnikov, Y.M., Andreev, Y.A., Kozlov, S.A., Vassilevski, A.A., Grishin, E.V. (2008) *Protein Expr. Purif.*, **60**, 89–95.
389. Vassilevski, A.A., Kozlov, S.A., Grishin, E.V. (2008) *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.*, **2**, 58–63.
390. Paetzel, M., Karla, A., Strynadka, N.C., Dalbey, R.E. (2002) *Chem. Rev.*, **102**, 4549–4580.
391. Schechter, I., Berger, A. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **27**, 157–162.
392. Seidah, N.G., Chretien, M. (1999) *Brain Res.*, **848**, 45–62.
393. Collins, S.P., Comis, A., Tyler, M.I., Marshall, M., Howden, M.E. (1995) *Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, **110**, 89–93.
394. Liang, S., Li, X., Cao, M., Xie, J., Chen, P., Huang, R. (2000) *J. Protein. Chem.*, **19**, 225–229.
395. Corzo, G., Gilles, N., Satake, H., Villegas, E., Dai, L., Nakajima, T.,

- Haupt, J. (2003) FEBS Lett., **547**, 43–50.
396. Milne, T.J., Abbenante, G., Tyndall, J.D., Halliday, J., Lewis, R.J. (2003) J. Biol. Chem., **278**, 31105–31110.
397. Eipper, B.A., Stoffers, D.A., Mains, R.E. (1992) Annu. Rev. Neurosci., **15**, 57–85.
398. Fricker, L.D. (1988) Annu. Rev. Physiol., **50**, 309–321.
399. Xin, X., Varlamov, O., Day, R., Dong, W., Bridgett, M.M., Leiter, E.H., Fricker, L.D. (1997) DNA Cell Biol., **16**, 897–909.
400. Salamoni, S.D., Costa da Costa, J., Palma, M.S., Konno, K., Nihei, K., Tavares, A.A., de Abreu, D.S., Venturin, G.T., de Borba Cunha, F., de Oliveira, R.M., Breda, R.V. (2005) Brain Res., **1048**, 170–176.
401. Mortari, M.R., Cunha, A.O., Ferreira, L.B., dos Santos, W.F. (2007) Pharmacol. Ther., **114**, 171–183.
402. Hancock, R.E., Sahl, H.G. (2006) Nat. Biotechnol., **24**, 1551–1557.
403. Piers, K.L., Brown, M.H., Hancock, R.E. (1993) Gene, **134**, 7–13.
404. Zhang, L., Falla, T., Wu, M., Fidai, S., Burian, J., Kay, W., Hancock, R.E. (1998) Biochem. Biophys. Res. Commun., **247**, 674–680.
405. Kass, R.S. (2005) J. Clin. Invest., **115**, 1986–1989.
406. Cannon, S.C. (2006) Annu. Rev. Neurosci., **29**, 387–415.
407. Catterall, W.A., Dib-Hajj, S., Meisler, M.H., Pietrobon, D. (2008) J. Neurosci., **28**, 11768–11777.
408. Pluzhnikov, K., Vassilevski, A., Korolkova, Y., Fisyunov, A., Iegorova, O., Krishtal, O., Grishin, E. (2007) Toxicon, **50**, 993–1004.
409. Khan, S.A., Zafar, Y., Briddon, R.W., Malik, K.A., Mukhtar, Z. (2006) Transgenic Res., **15**, 349–357.
410. Hernandez-Campuzano, B., Suarez, R., Lina, L., Hernandez, V., Villegas, E., Corzo, G., Iturriaga, G. (2009) Toxicon, **53**, 122–128.
411. Fitches, E., Edwards, M.G., Mee, C., Grishin, E., Gatehouse, A.M., Edwards, J.P., Gatehouse, J.A. (2004) J. Insect Physiol., **50**, 61–71.
412. Osusky, M., Zhou, G., Osuska, L., Hancock, R.E., Kay, W.W., Misra, S. (2000) Nat. Biotechnol., **18**, 1162–1166.
413. Montesinos, E. (2007) FEMS Microbiol. Lett., **270**, 1–11.
414. Hughes, S.R., Dowd, P.F., Hector, R.E., Panavas, T., Sterner, D.E., Qureshi, N., Bischoff, K.M., Bang, S.S., Mertens, J.A., Johnson, E.T., Li, X.L., Jackson, J.S., Caughey, R.J., Riedmuller, S.B., Bartoletti, S., Liu, S., Rich, J.O., Farrelly, P.J., Butt, T.R., Labaer, J., Cotta, M.A. (2008) J. Pept. Sci., **14**, 1039–1050.
415. Hughes, S.R., Sterner, D.E., Bischoff, K.M., Hector, R.E., Dowd, P.F., Qureshi, N., Bang, S.S., Grynaviski, N., Chakrabarty, T., Johnson, E.T., Dien, B.S., Mertens, J.A., Caughey, R.J., Liu, S., Butt, T.R., Labaer, J., Cotta, M.A., Rich, J.O. (2008) Plasmid, **61**, 22–38.
416. Billen, B., Vassilevski, A., Nikol'sky, A., Tytgat, J., Grishin, E. (2008) Toxicon, **52**, 309–317.
417. Foelix, R.F. (1996) Biology of spiders. New York; Oxford: Oxford University Press, 330 p.
418. Ruppert, E.E., Fox, R.S., Barnes, R.D. (2003) Invertebrate zoology: a functional evolutionary approach. Pacific Grove; London: Brooks/Cole, xvii, 963, 26 p.
419. Nentwig, W., Aitchison-Benell, C.W. (1987) Ecophysiology of spiders. Berlin; New York: Springer-Verlag, ix, 448 p.
420. Oxford, G.S., Gillespie, R.G. (1998) Annu. Rev. Entomol., **43**, 619–643.
421. Whitehouse, M.E., Lubin, Y. (2005) Biol. Rev. Camb. Philos. Soc., **80**, 347–361.

422. *Cushing, P.E.* (1997) Florida Entomologist, **80**, 165–193.
423. *Jackson, R.R., Pollard, S.D.* (1996) Annu. Rev. Entomol., **41**, 287–308.
424. *Allan, R.A., Capon, R.J., Brown, W.V., Elgar, M.A.* (2002) J. Chem. Ecol., **28**, 835–848.
425. *Elgar, M.A., Allan, R.A.* (2004) Naturwissenschaften, **91**, 143–147.
426. *Eberhard, W.G.* (1977) Science, **198**, 1173–1175.
427. *Stowe, M.K., Tumlinson, J.H., Heath, R.R.* (1987) Science, **236**, 964–967.
428. *Gemeno, C., Yeorgan, K.V. Haynes, K.F.* (2000) J. Chem. Ecol., **26**, 1235–1243.
429. *Harland, D.P., Jackson, R.R.* (2000) Cimbebasia, **16**, 231–240.
430. *Eisner, T., Camazine, S.* (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**, 3382–3385.
431. *Arzt, E., Gorb, S., Spolenak, R.* (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **100**, 10603–10606.
432. *Kesel, A.B., Martin, A. Seidl, T.*, (2003) J. Exp. Biol., **206**, 2733–2738.
433. *Gorb, S.N., Niederegger, S., Hayashi, C.Y., Summers, A.P., Votsch, W., Walther, P.* (2006) Nature, **443**, 407.
434. *Craig, C.L.* (2003) Spiderwebs and silk: tracing evolution from molecules to genes to phenotypes. New York: Oxford University Press, xxv, 230 p.
435. *Vollrath, F.* (2000) J. Biotechnol., **74**, 67–83.
436. *Rising, A., Nimmervoll, H., Grip, S., Fernandez-Arias, A., Storckenfeldt, E., Knight, D.P., Vollrath, F., Engstrom, W.* (2005) Zool. Sci., **22**, 273–281.
437. *Vollrath, F.* (2005) Curr. Biol., **15**, R364–R365.
438. *Kluge, J.A., Rabotyagova, O., Leisk, G.G., Kaplan, D.L.* (2008) Trends Biotechnol., **26**, 244–251.