

# Sea anemone toxins: insecticides and painkillers of the future?

Jan Tytgat

Laboratory of Toxicology  
Leuven, Belgium

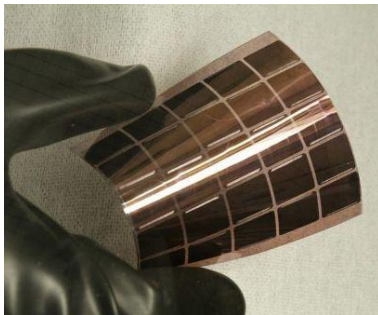
[www.toxicology.be](http://www.toxicology.be)



*CSA MARINEBIOTECH Conference - 11-12 March 2013*

# Marine Biotechnology

- new medicines and diagnostics
- cleaning up pollutants by bacteria: environment
- increase food supply for growing population
- enhance food quality and safety
- development of new materials





## The FASEB Journal

The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology



Promiscuous Behavior of Anemone Toxins at Voltage-gated Ion Channels p. 5141

December 2013 Vol. 34, No. 12

Wetenschap

### PLANEET DRAULANS

DIK DRACULANS GIST U DOOR DE WERELD VAN NATUUR EN WETENSCHAP



5140

'Zelfs wie zich afzet tegen het voorbeeld van zijn moeder, belandt vaak in hetzelfde patroon. Onbewust volgen we het geëffende pad.'

Psychologe Ili Freud in Psychologie Magazine.

### De zeeanemoon stilt onze pijn

Het gif van de zeeanemoon kan ingezet worden als een efficiënt insecticide.

Een hoekje van het dierenrijk kan voor verrassingen zorgen. Toxicoloog Jan Tytgat en zijn collega's van de Katholieke Universiteit Leuven bogen zich over het gif waarmee zeeanemonen zich weren tegen hun aanvallers. Deze anemonen zijn geen planten, maar vassitzende diertjes verwant aan kwalen. Ze kunnen zogenaamde netelcellen afschieten naar belagers.

In die cellen zit een krachtig gif. Volgens de resultaten van het Leuvense onderzoek, verschenen in *The FASEB Journal*, is het gif een echte cocktail van toxische stoffen. Het mikt op zoveel verschillende doelen, dat de kans op overleving zogoed als onbestaande is.

Een van de stoffen valt het zenuwstelsel aan, ook dat van insecten. Nochtans krijgen zeeanemonen nooit een insect te zien, maar wel schaaldieren die eraan verwant zijn. Tytgat maakt zich sterk dat hier een ultieme doeltreffend insecticide uit te maken is, dat bovendien milieuvriendelijk zou zijn, omdat het gebaseerd is op een natuurlijk product dat, in tegenstelling tot synthetische stoffen als DDT, gemakkelijk afbreekt. Het nieuwe gif zou overigens krachtiger zijn dan DDT.

De toxicoloog meent dat het mogelijk

moet zijn planten genetisch zo te manipuleren dat ze de giftige stof zelf aanmaken, zodat insecten die eraan knagen meteen het loodje leggen. Dat zou geen unicum zijn, want de nicotine in de tabakspiant die onze rokkers zo geweldig vindt, is een natuurlijk insectenbestrijder.

Een andere stof uit het zeeanemonengif blijkt de potentie van een krachtige pijnstiller voor mensen te hebben, naar analogie van een stof die oot uit het gif van een zeeslak werd gedistilleerd en nu als een middel tegen chronische pijn op de markt is.

Wannes Dermaux en zijn collega's van de Vakgroep Gewasbescherming aan de Universiteit Gent tonen in de *Proceedings of the National Academy of Sciences* aan dat mijten en insecten die zich van verschillende plantensoorten voeden, meerdere systemen ontwikkelden om de toxische stoffen te counteren die planten als verdediging produceren. Besties die zo veelzijdig zijn worden ook onsmakelijk.

De onderzoekers zeggen dat het mogelijk is om de gifstoffen van de zeeanemoon te kopiëren en te gebruiken als insecticide. Het nieuwe gif zou overigens krachtiger zijn dan DDT.



43%

De ecologische voetafdruk van de gemiddelde wereld. Maar volgens landbouwconcern Wm van de Vasthoop is dat er geen probleem is. De consumptiepatronen dringt dat niet goed door.



## Kleurrijke 'bloemdiertjes' leveren basis voor insecticiden en pijnstillers

### Het wondergift van zeeanemonen

In de gifcocktail van zeeanemonen zitten stoffen die totaal nieuwe pijnstillers én milieuvriendelijke insecticiden kunnen opleveren. 'We waren zelf ook verrast', zegt onderzoeker Jan Tytgat. *Barbara Debusschere*

De gifcocktail van zeeanemonen is een cocktail van toxische stoffen die op zoveel verschillende doelen mikt, dat de kans op overleving zogoed als onbestaande is. Een van de stoffen valt het zenuwstelsel aan, ook dat van insecten. Nochtans krijgen zeeanemonen nooit een insect te zien, maar wel schaaldieren die eraan verwant zijn. Tytgat maakt zich sterk dat hier een ultieme doeltreffend insecticide uit te maken is, dat bovendien milieuvriendelijk zou zijn, omdat het gebaseerd is op een natuurlijk product dat, in tegenstelling tot synthetische stoffen als DDT, gemakkelijk afbreekt. Het nieuwe gif zou overigens krachtiger zijn dan DDT.

De gifcocktail van zeeanemonen is een cocktail van toxische stoffen die op zoveel verschillende doelen mikt, dat de kans op overleving zogoed als onbestaande is. Een van de stoffen valt het zenuwstelsel aan, ook dat van insecten. Nochtans krijgen zeeanemonen nooit een insect te zien, maar wel schaaldieren die eraan verwant zijn. Tytgat maakt zich sterk dat hier een ultieme doeltreffend insecticide uit te maken is, dat bovendien milieuvriendelijk zou zijn, omdat het gebaseerd is op een natuurlijk product dat, in tegenstelling tot synthetische stoffen als DDT, gemakkelijk afbreekt. Het nieuwe gif zou overigens krachtiger zijn dan DDT.

Over de toxines van de zeeanemoon zitten stoffen die veel doeltreffender zijn dan DDT



# Bioactive compounds with therapeutic potential

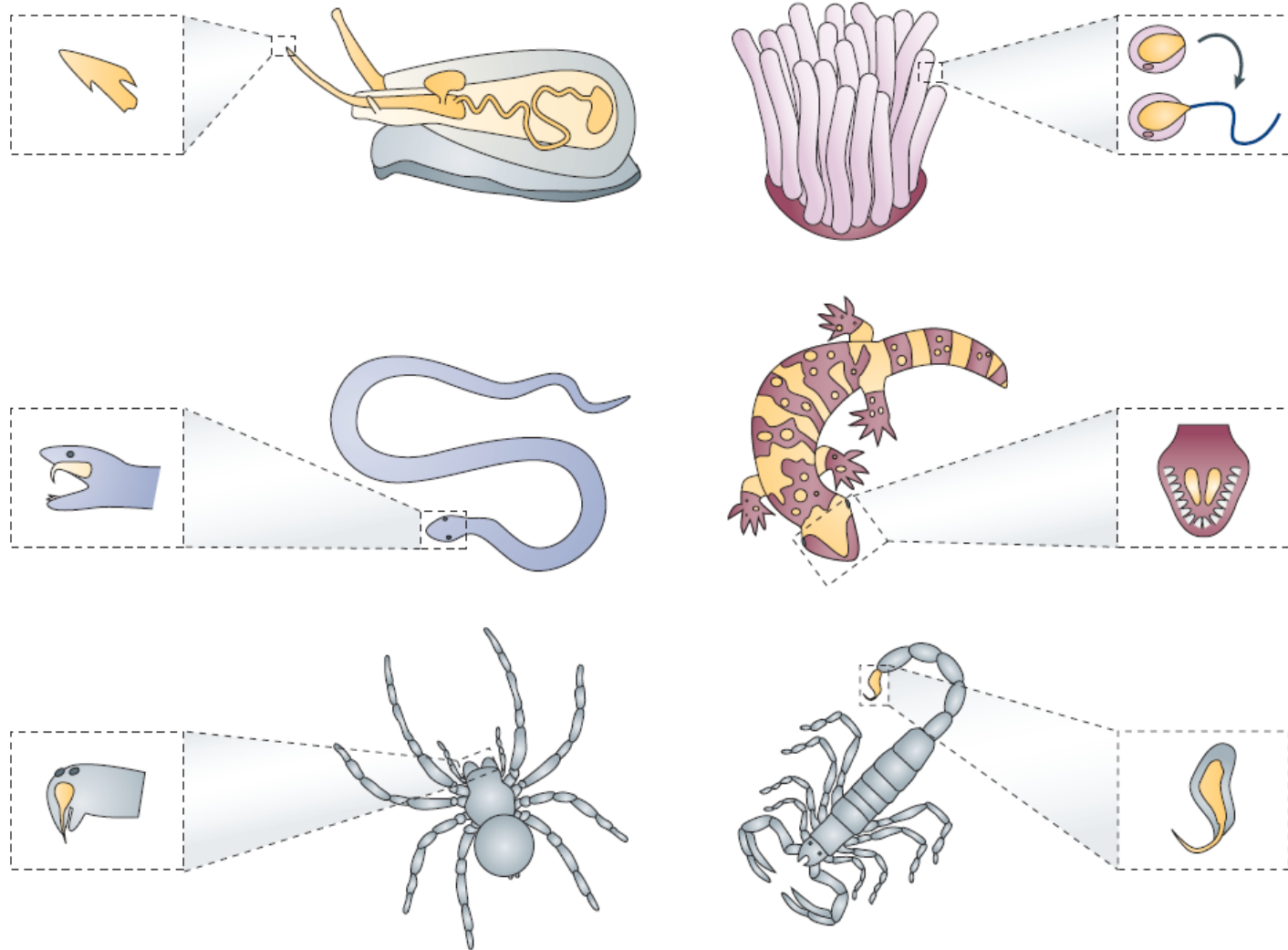
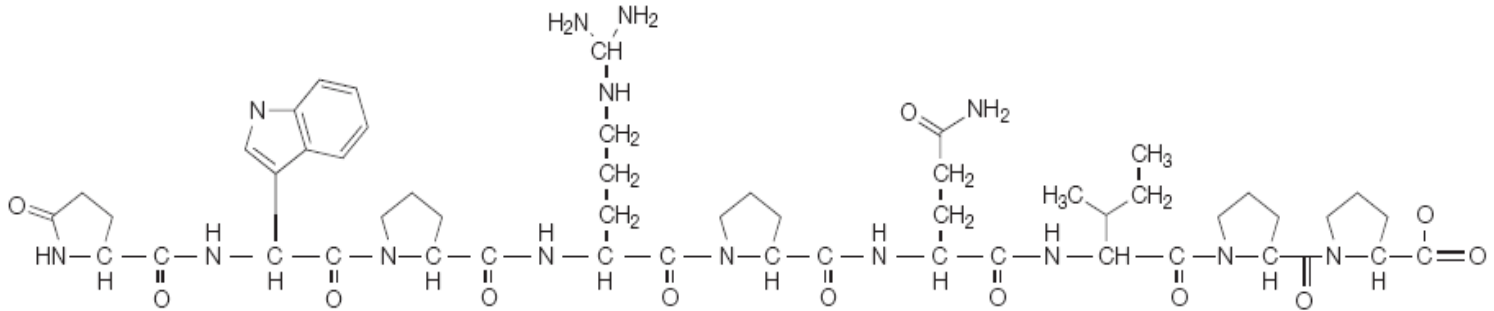


Figure 1 | **Cone snail, sea anemone, snake, Gila monster, spider and scorpion produce venom peptides with therapeutic potential.** All groups are widely distributed in tropical to temperate regions, except the Gila monster which is found from southwestern United States to central America. The envenomation apparatus are highlighted (harpoon, nematocysts, teeth and sting).

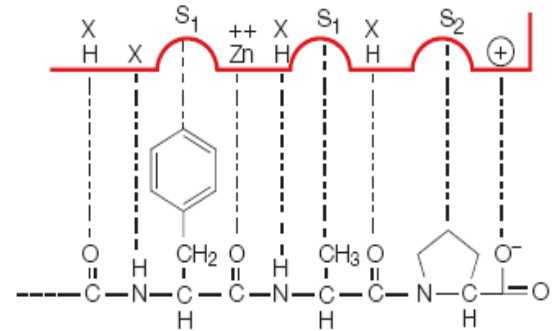
# First venom-based drug: Captopril (Capoten®)



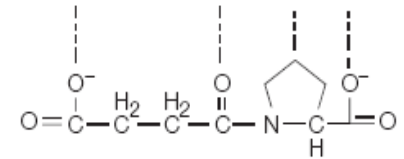
*Bothrops jararaca*



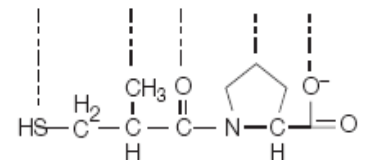
**a** Venom peptide (Teprotide)



**b** Venom peptide analogue



**c** Succinyl-Pro

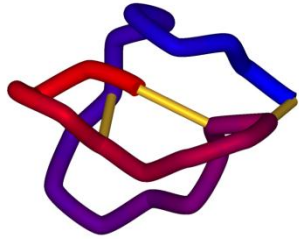


**d** Captopril

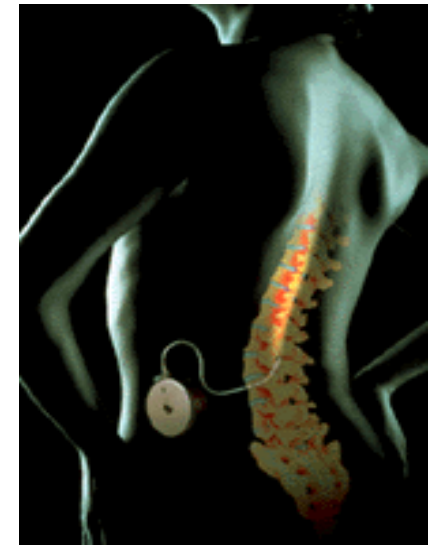
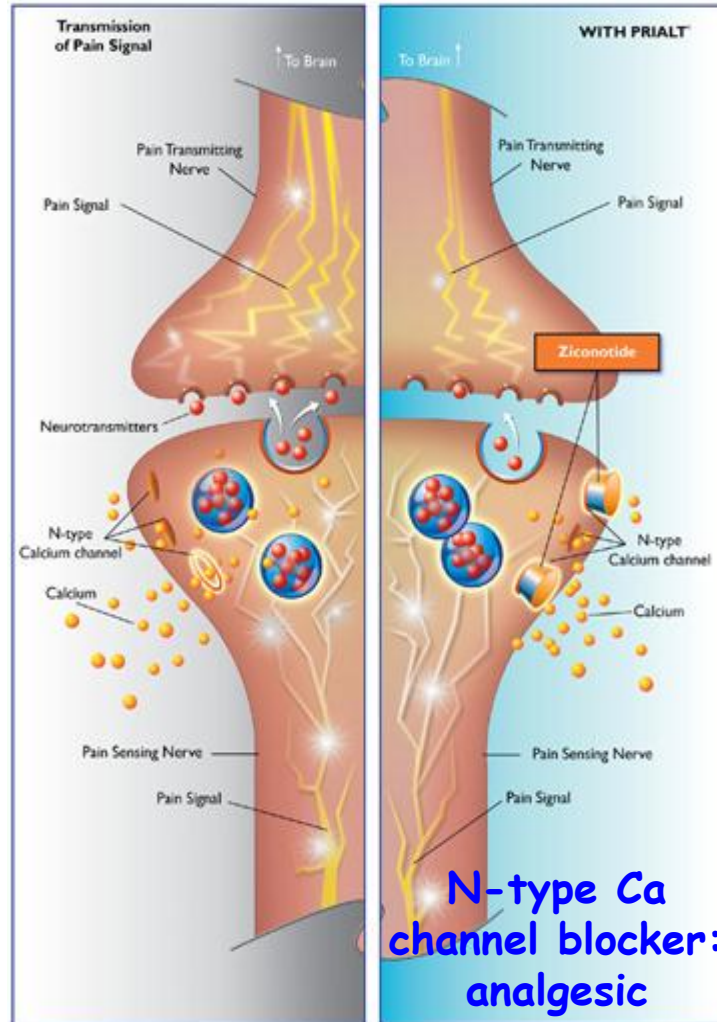
**ACE-inhibitor:  
antihypertensive**

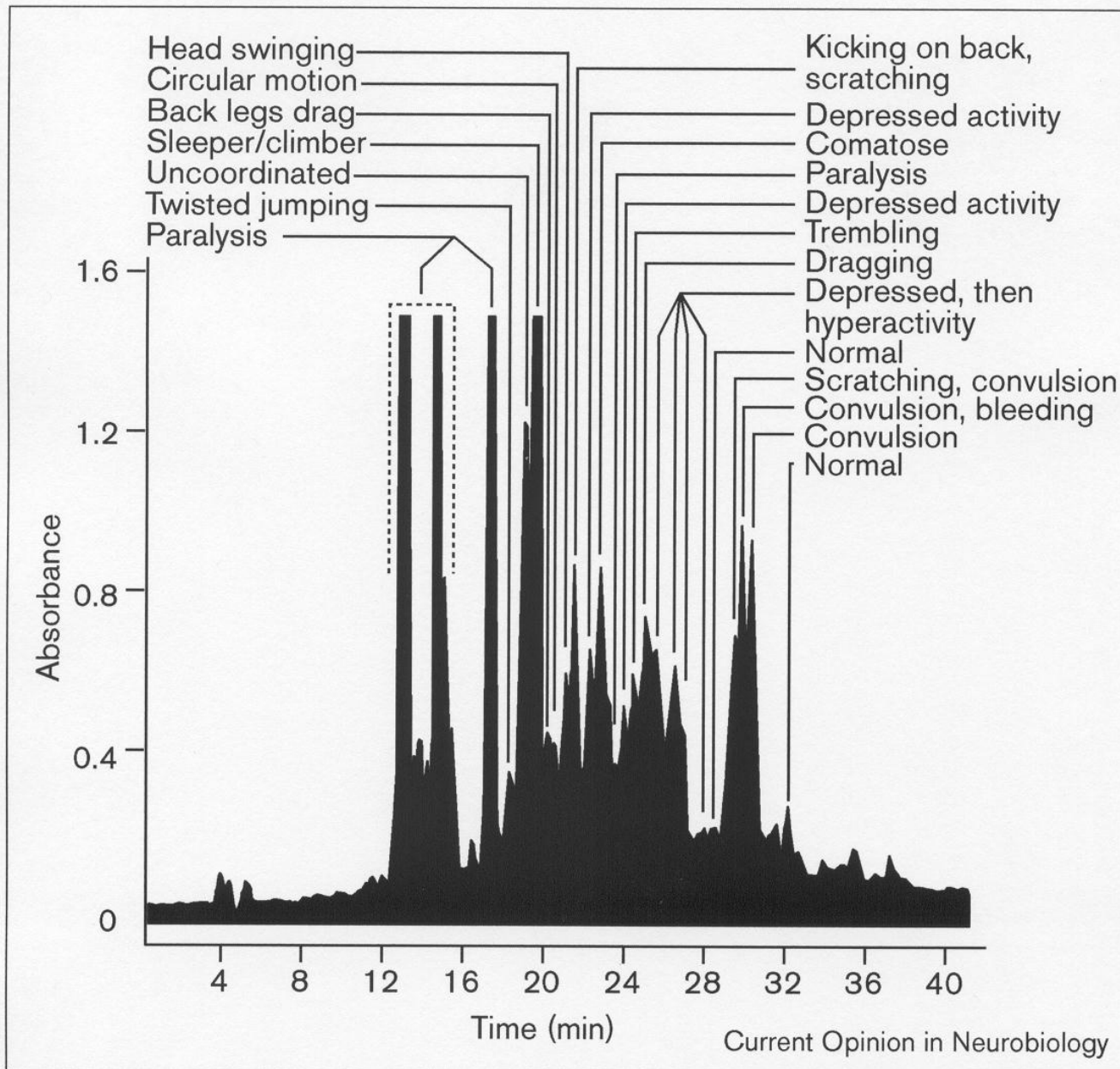
# Second venom-based drug: Ziconotide (Prialt®)

H-Cys-Lys-Gly-Lys-Gly-Ala-Lys-Cys-Ser-Arg-Leu-Met-Tyr-Asp-Cys-Cys-Thr-Gly-Ser-Cys-Arg-Ser-Gly-Lys-Cys-NH2



*Conus magus*





**Table 3. Therapeutic Applications of Conopeptides**

Clinical application	Conopeptide	Sequence	Target	Clinical status	References
Pain	$\omega$ -MVIIA (Ziconitide, Prialt®)	CKGKGAKCSRLMYDCCTGSCRSKGC*	Ca <sup>2+</sup> channel (Ca <sub>v</sub> 2.2)	FDA approved	(35, 36, 42)
Pain	$\omega$ -CVID (AM336)	CKSKGAKCSKLMYDCCSGSCSGTVGRC*	Ca <sup>2+</sup> channel (Ca <sub>v</sub> 2.2)	Phase I	(43–45)
Pain	Contulakin-G (CGX-1160)	ZSEEGGSNATKKPYIL	Neurotensin receptor	Phase I	(46)
Pain	$\alpha$ -Vc1.1 (ACV1)	GCCSDPRCNYDHPEIC*	nAChR ( $\alpha$ 9 $\alpha$ 10)	Phase I	(13, 47, 48)
Pain	$\chi$ -MrlA (Xen2174)	NGVCCGYKLCHOC	Norepinephrine transporter	Phase I	(49)
Pain/Neuro- protection	Conantokin-G (CGX-1007)	GE $\gamma$ $\gamma$ LQ $\gamma$ NQ $\gamma$ LIR $\gamma$ KSN*	NMDA receptor (NR2B)	Preclinical	(50–53)
Epilepsy	Conantokin-G (CGX-1007)	GE $\gamma$ $\gamma$ LQ $\gamma$ NQ $\gamma$ LIR $\gamma$ KSN*	NMDA receptor (NR2B)	Phase I	(50–52, 54)
Pain	$\mu$ -conotoxins	Various	Na <sup>+</sup> channels	Preclinical	(55, 56)
Myocardial infarction	$\kappa$ -PVIIA (CGX-1051)	CRIONQKCFQHLDCCSRKCNRFNKCV	K <sup>+</sup> channel (K <sub>v</sub> 1)	Preclinical	(57, 58)

Z, pyroglutamate; O, 4-trans-hydroxyproline;  $\gamma$ ,  $\gamma$ -carboxyglutamate;  $\bar{I}$ , O-glycosylated threonine; \*, C-terminal amidation; nAChR, nicotinic acetylcholine receptor; NMDAR, N-methyl-D-aspartate receptor. A derivative of  $\chi$ -MrlA, rather than the native peptide, advanced to human clinical trials.



# Marine Biotechnology

## 3 examples of opportunities



# Classes

**Anthozoa** (*sea anemones*)



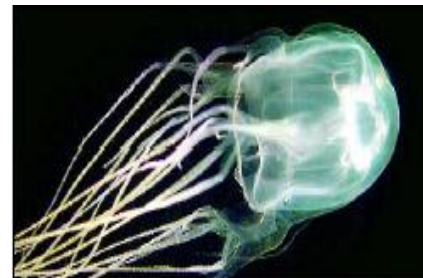
**Hydrozoa** (*portuguese man-of-war*)

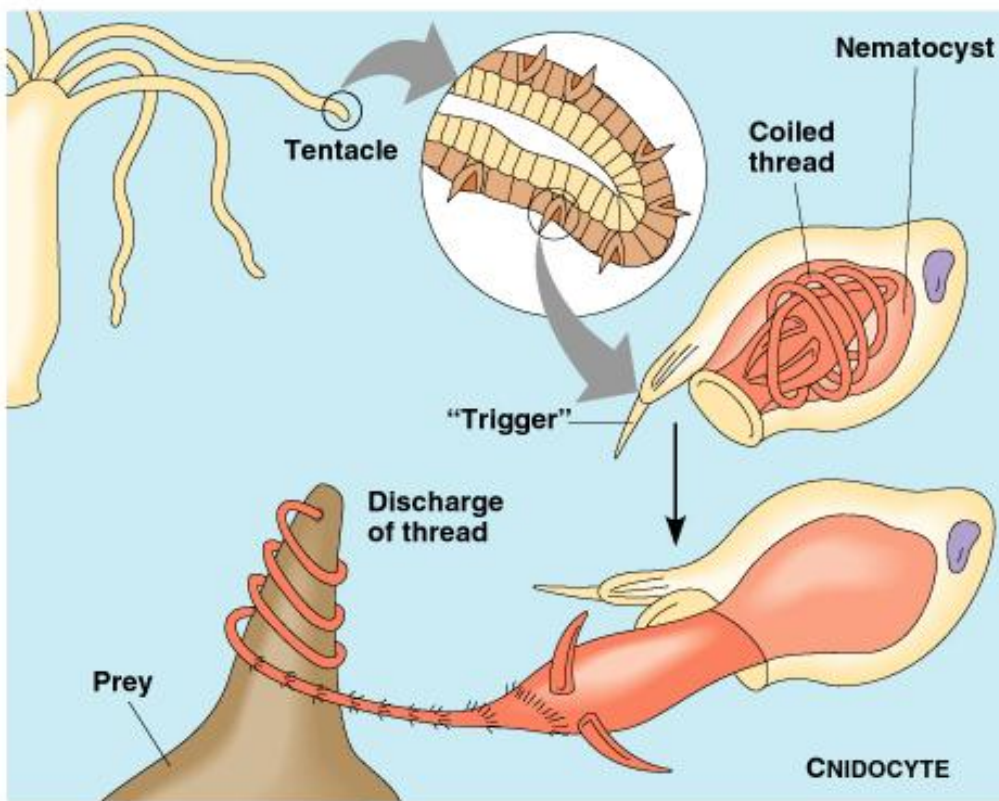


**Scyphozoa** (*true jellyfish*) most common



**Cubozoa** (*Box jellyfish*) most toxic





# Local Effects

## ACUTE

Burning pain

Oedema

Contact dermatitis

Urticaria

Necrosis

## CHRONIC

Spasms

Gangrene

Hyperpigmentation

Scarring

Atrophy



# Systemic Effects

Nausea

Vomiting

Brochospasm

Hypertensive crisis

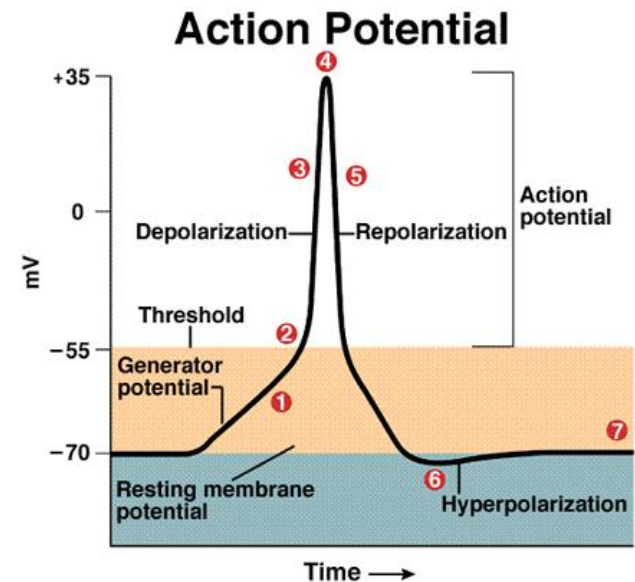
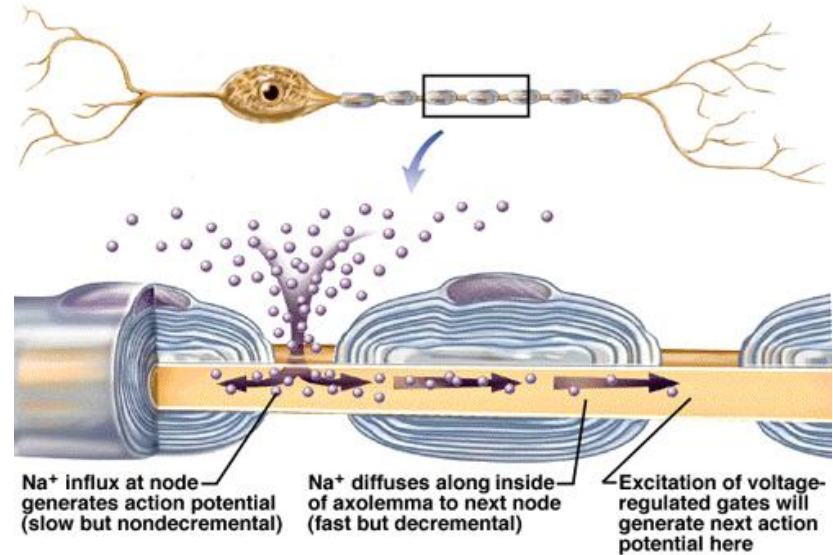
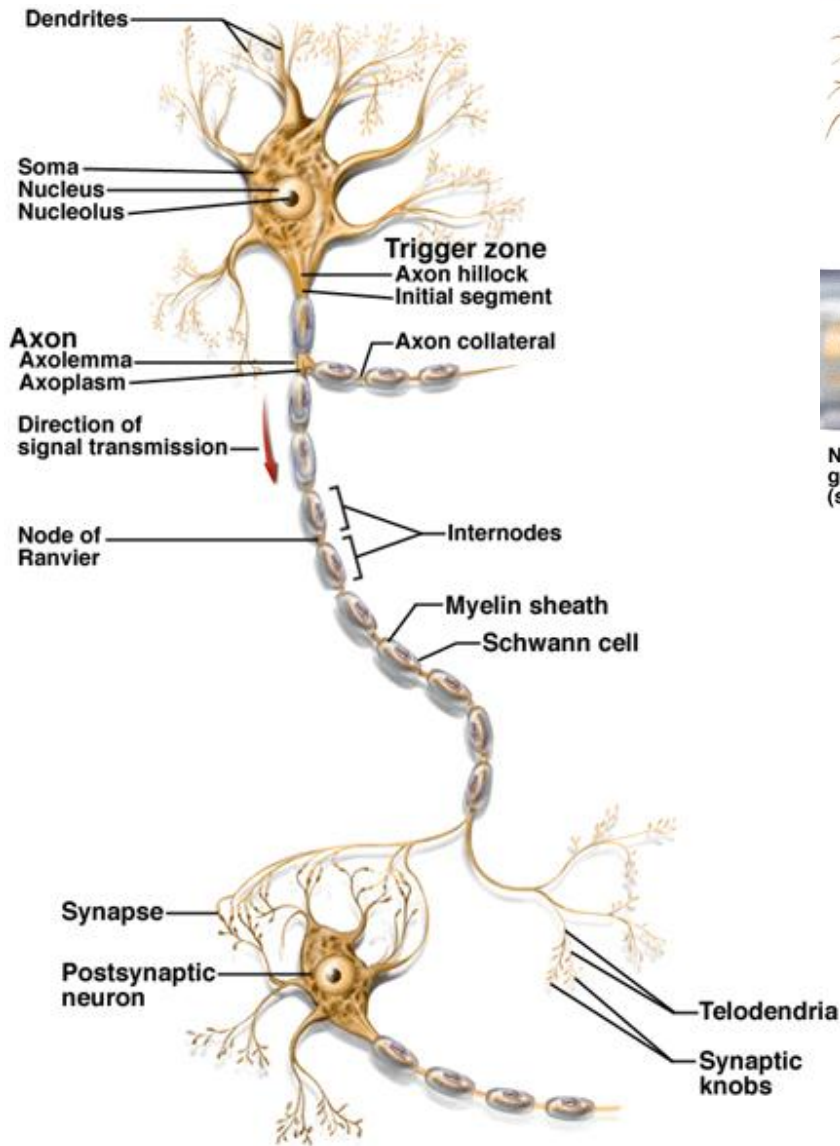
Cardiac arrhythmia

Respiratory insufficiency

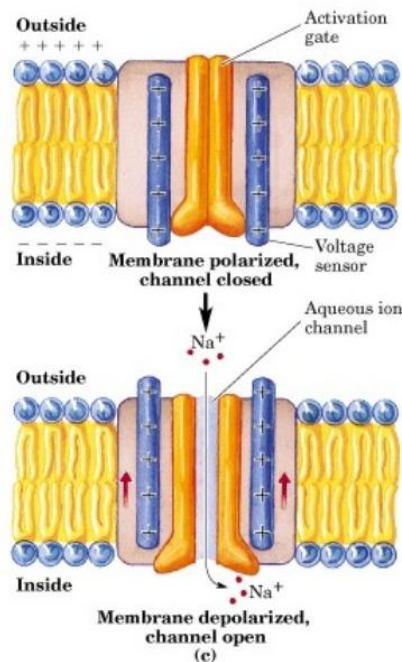
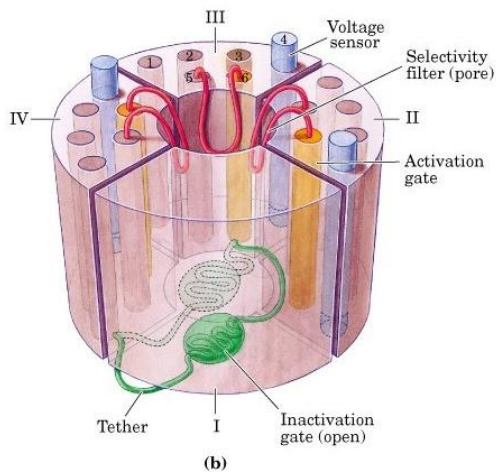
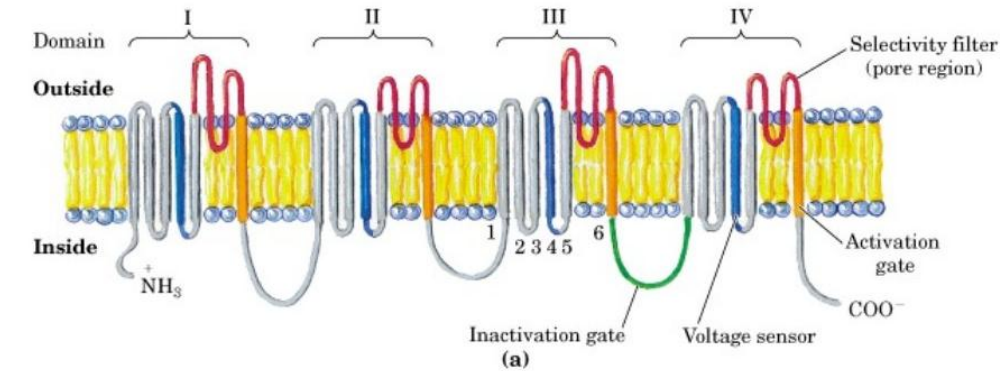
Acute pulmonary oedema



# "Key" target: the voltage-gated Na Channel ( $Na_v$ )



# "Key" target: the voltage-gated Na Channel ( $\text{Na}_v$ )



- Contribute to generation and propagation of APs
- $\alpha$  subunit (260 kDa) + up to 4  $\beta$  subunits (30 kDa)
- Voltage dependent
- Vertebrate:  $\text{Na}_v1.1$  to  $\text{Na}_v1.9$ ;  
Invertebrate: *Drosophila*,  
*housefly*, *cockroach*
- TTX-R and TTX-S VGSCs
- Channelopathies:  
neuromuscular diseases,  
heart and brain disorders
- Involved in nociception  
( $\text{Na}_v1.3$ ,  $\text{Na}_v1.7$ ,  $\text{Na}_v1.8$ ,  $\text{Na}_v1.9$ )

# Conservation of the human Na<sub>v</sub> channels (% identity)

	hNa <sub>v</sub> 1.1 P35498	hNa <sub>v</sub> 1.2 Q99250	hNa <sub>v</sub> 1.3 Q9NY46	hNa <sub>v</sub> 1.4 P35499	hNa <sub>v</sub> 1.5 Q14524	hNa <sub>v</sub> 1.6 Q9UQD0	hNa <sub>v</sub> 1.7 Q15858	hNa <sub>v</sub> 1.8 Q9UI33
hNa <sub>v</sub> 1.2	87							
hNa <sub>v</sub> 1.3	83	87						
hNa <sub>v</sub> 1.4	73	74	72					
hNa <sub>v</sub> 1.5	61	62	62	67				
hNa <sub>v</sub> 1.6	75	75	73	74	61			
hNa <sub>v</sub> 1.7	76	77	75	72	60	70		
hNa <sub>v</sub> 1.8	55	56	55	63	62	55	55	
hNa <sub>v</sub> 1.9	52	52	53	49	55	53	54	55

**49 – 87 %  
identity**

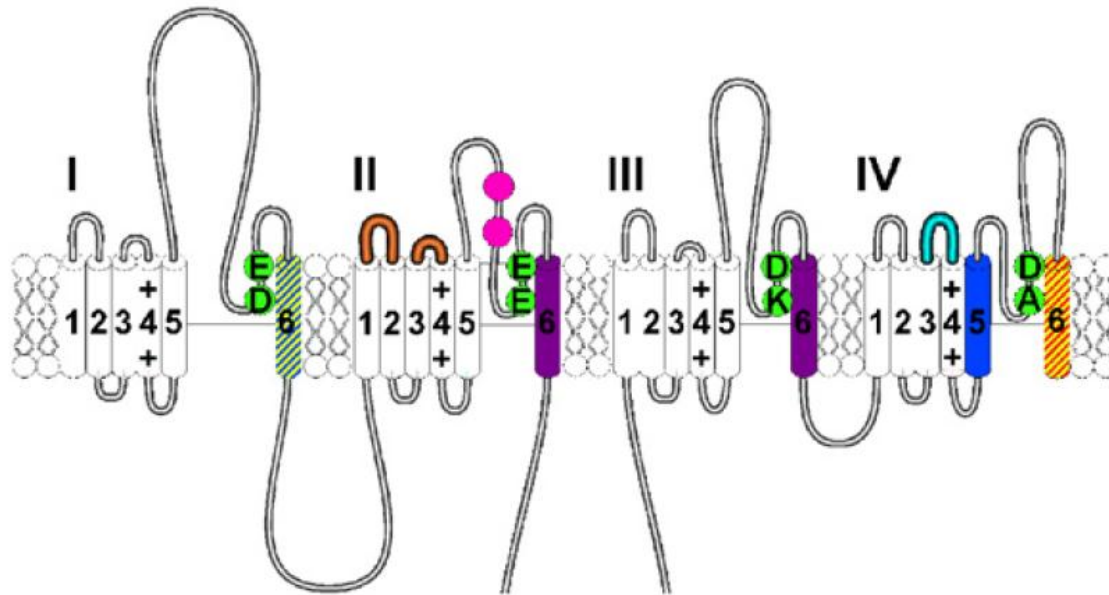


# Conservation of the insect *para*-type channels (% identity)

	<i>Drosophila melanogaster</i> P35500	<i>Musca domestica</i> Q94615	<i>Anopheles gambiae</i> A5I843	<i>Bombyx mori</i> A5A2M4	<i>Blattella germanica</i> O01307	<i>Heliothis virescens</i> Q94584	<i>Nasonia vitripennis</i> A5I9E9
<i>Musca domestica</i>	87						
<i>Anopheles gambiae</i>	81	80					
<i>Bombyx mori</i>	79	78	82				
<i>Blattella germanica</i>	78	75	81	81			
<i>Heliothis virescens</i>	80	79	83	94	83		
<i>Nasonia vitripennis</i>	76	76	79	80	81	83	
<i>Pediculus h. corporis</i>	74	74	76	77	79	77	77

**74 – 94 %  
identity**

# Na<sub>v</sub> Channel Sites



**Site 1** Tetrodotoxin  
Saxitoxin  
Hainantoxin-I

**Site 1**  $\mu$ -Conotoxins

**Site 2** Batrachotoxin  
Veratridine

**Site 3** Scorpion  $\alpha$ -toxins  
Sea anemone toxins  
 $\delta$ -Atracotoxins

**Site 3** Tx4(6-1)  
Magi 2

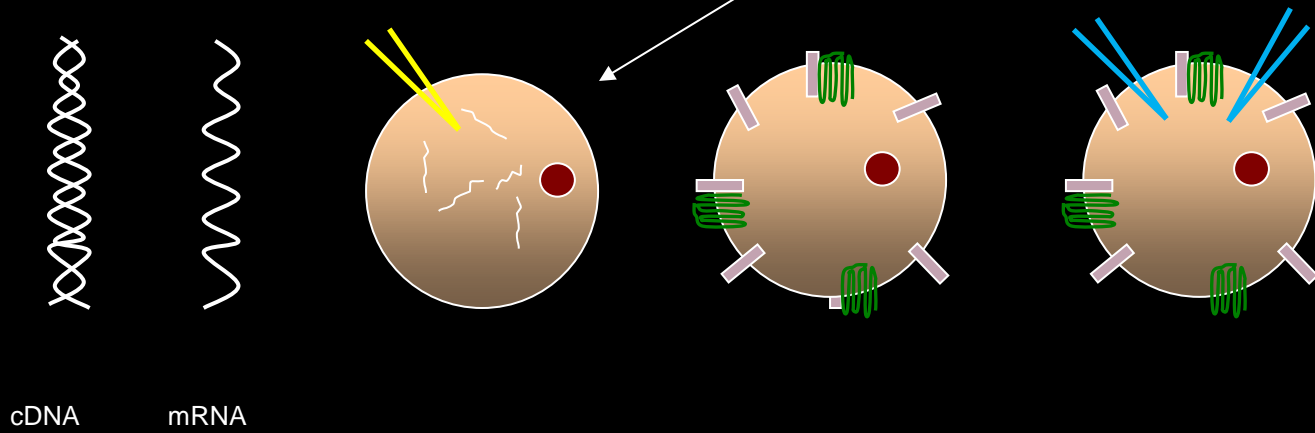
**Site 4** Scorpion  $\beta$ -toxins  
 $\delta$ -Palutoxins

**Site 5** Ciguatoxins  
Brevetoxins

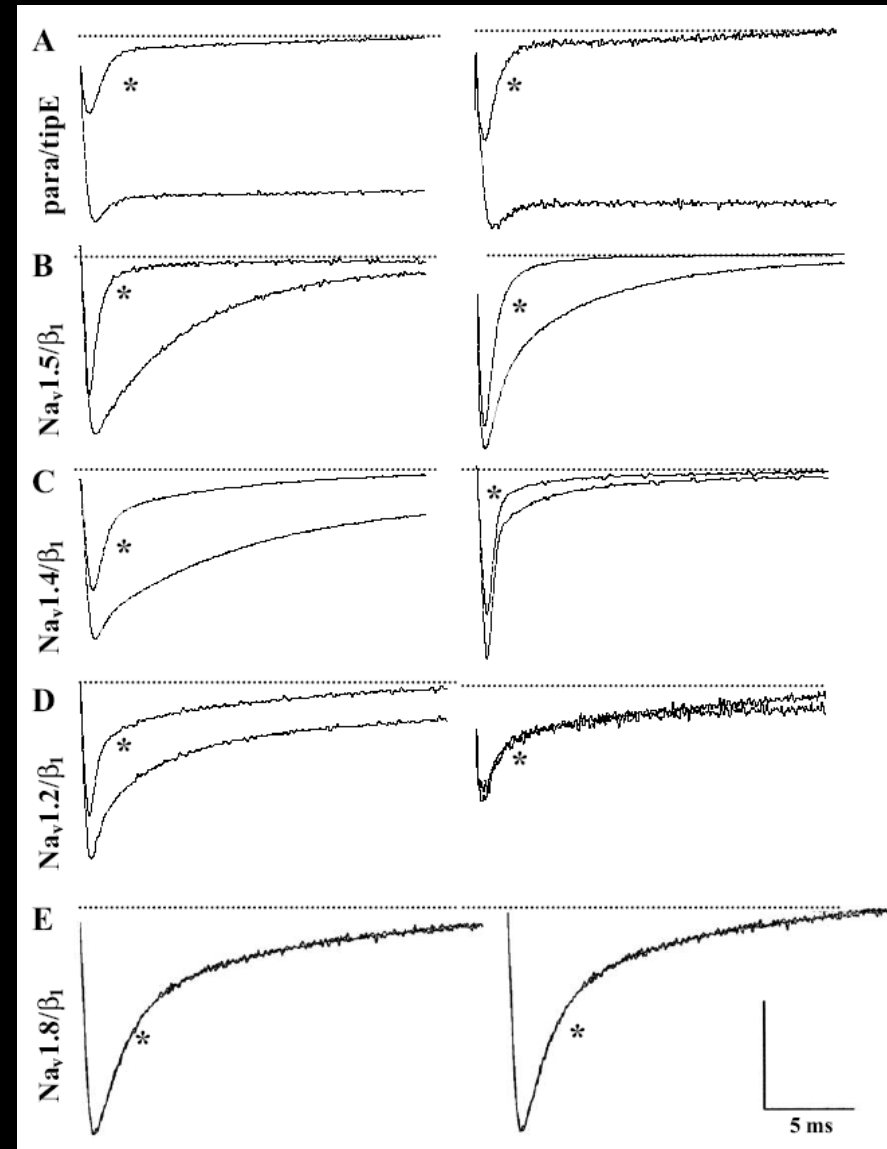
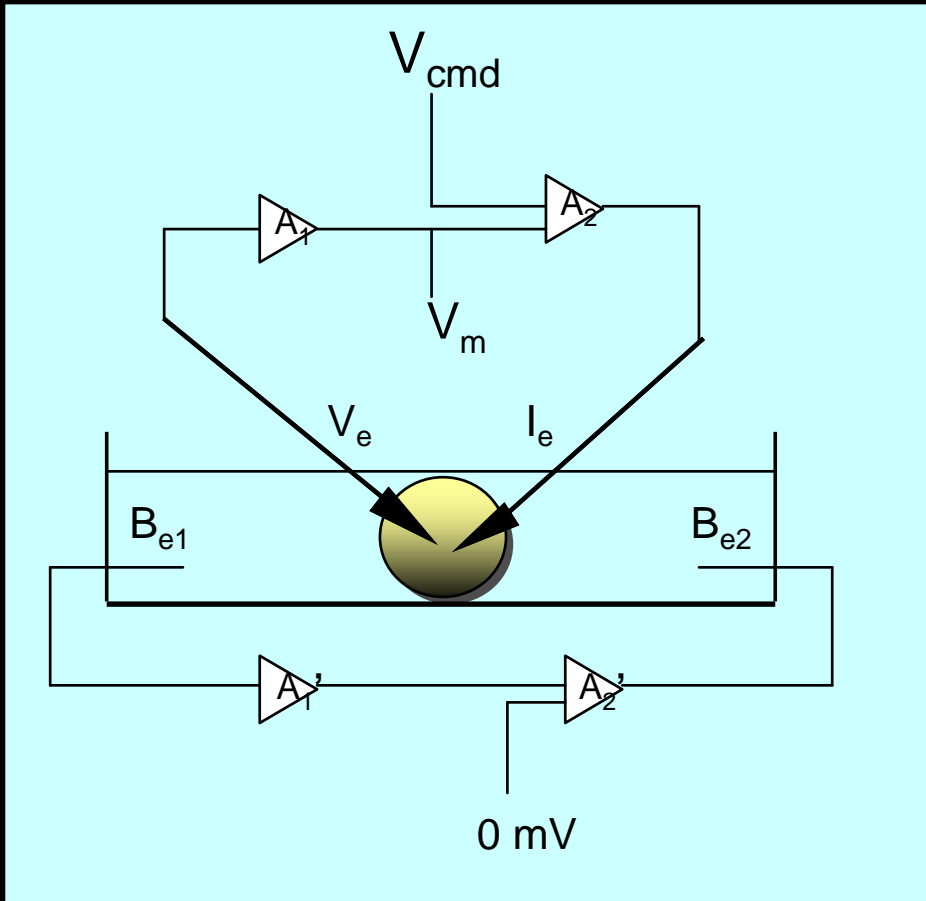
**Site 7** Pyrethroids

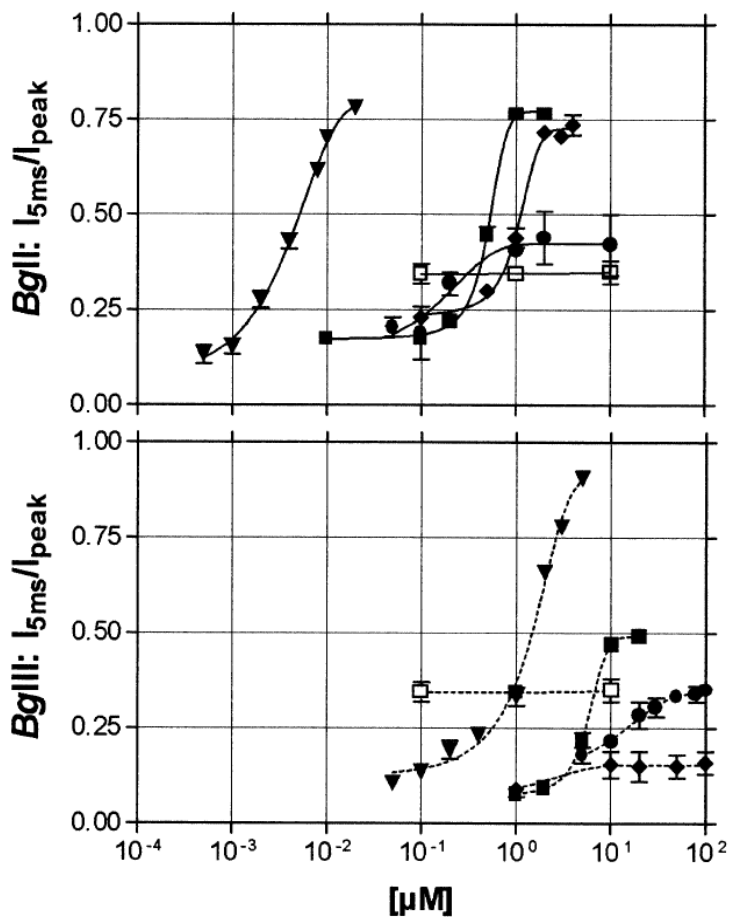
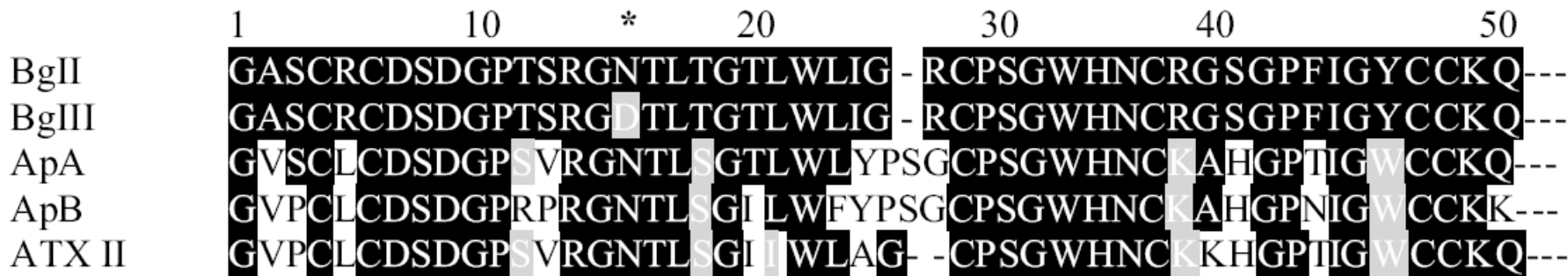
**Drugs** Local anaesthetics  
Anticonvulsants

# Recombinant expression: biotechnology of today



# Two-Electrode Voltage Clamp Technique





**Novel Insecticides!**

*Bunodosoma granulifera*



Summary of the obtained EC<sub>50</sub> values of BgII and BgIII on the VGSCs

	EC <sub>50</sub> BgII	EC <sub>50</sub> BgIII
Para/tipE	5.5 ± 0.5 nM	1.3 ± 0.2 µM
Nav 1.2/β <sub>1</sub>	0.3 ± 0.2 µM	18.9 ± 2.0 µM
Nav 1.5/β <sub>1</sub>	0.5 ± 0.1 µM	5.1 ± 0.5 µM
Nav 1.4/β <sub>1</sub>	1.0 ± 0.1 µM	9.8 ± 0.9 µM
Nav 1.8/β <sub>1</sub>	-	-

Data are mean ± S.E.M. of at least three experiments.

# The sea anemone *Bunodosoma granulifera* contains surprisingly efficacious and potent insect-selective toxins

Frank Bosmans<sup>a</sup>, Abel Aneiros<sup>b</sup>, Jan Tytgat<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Toxicology, University of Leuven, E. Van Evenstraat 4, B-3000 Leuven, Belgium

<sup>b</sup>Instituto de Oceanologica, Loma y 37 Alturas del Vedado, 10600 La Habana, Cuba



Toxicon 49 (2007) 550–560

---

---

**TOXICON**

---

---

[www.elsevier.com/locate/toxicon](http://www.elsevier.com/locate/toxicon)

Review

## Sea anemone venom as a source of insecticidal peptides acting on voltage-gated Na<sup>+</sup> channels

Frank Bosmans<sup>a,b</sup>, Jan Tytgat<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Molecular Physiology and Biophysics Section, Porter Neuroscience Research Center, Building 35, 3B 211, NINDS, NIH, Bethesda, MD 20892, USA

<sup>b</sup>Laboratory of Toxicology, University of Leuven, O&N 2, Postbus 922, Herestraat 49, 3000 Leuven, Belgium



- *Anthopleura elegantissima*
- aggregating anemone
- habitat: Pacific coast North America
- medium size: 2-7 cm
- preys on crustacea and small fish

# Target promiscuity of sea anemone peptides

APET<sub>x3</sub>

GTPCYCGKTIGIYWFGTKT<sup>C</sup>PSNRGYTGSC<sup>C</sup>GYFLGI<sup>CC</sup>YPVD

**The FASEB Journal**

The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology



Promiscuous  
Behavior of  
Anemone  
Toxins at  
Voltage-gated  
Ion Channels  
p. 5141

December 2012  
Vol. 26, No. 12

*The FASEB Journal* • Research Communication

## A natural point mutation changes both target selectivity and mechanism of action of sea anemone toxins

Steve Peigneur,\* László Béress,<sup>†,‡</sup> Carolina Möller,<sup>§</sup> Frank Mari,<sup>§</sup>  
Wolf-Georg Forssmann,<sup>†,‡</sup> and Jan Tytgat<sup>\*,1</sup>

\*Laboratory of Toxicology, University of Leuven (Katholieke Universiteit Leuven), Leuven, Belgium;  
<sup>†</sup>Department of Immunology and Rheumatology, Hannover Medical University, Hannover, Germany;  
<sup>‡</sup>Pharis Biotec GmbH, Hannover, Germany; and <sup>§</sup>Department of Chemistry and Biochemistry, Florida Atlantic University, Boca Raton, Florida, USA

*Vol. 26, 5141-5151 (2012)*



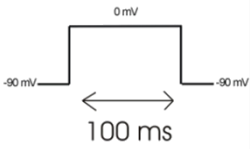
# Target promiscuity of sea anemone peptides

APET<sub>x3</sub> GTPCYCGKTIGIYWFGTKTCPSNRGYTGSCGYFLGICCYPVD

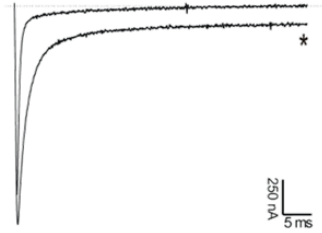
APET<sub>x1</sub> GTPCYCGKTIGIYWFGTKTCPSNRGYTGSCGYFLGICCYPVD

APET<sub>x2</sub> GTACSCGNSKGIYWFYRPS CPTDRGYTGSCRYFLGTCCTPAD

# APETx3



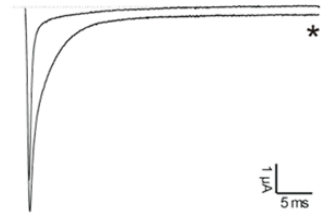
Na<sub>v</sub>1.2



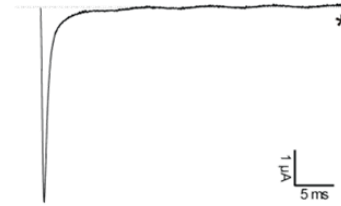
Na<sub>v</sub>1.3



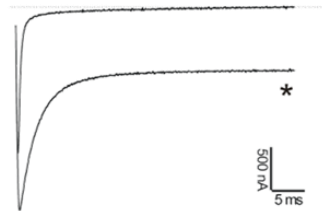
Na<sub>v</sub>1.4



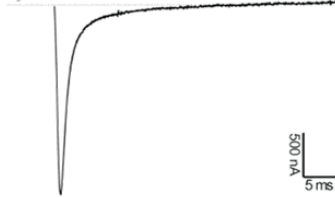
Na<sub>v</sub>1.5



Na<sub>v</sub>1.6



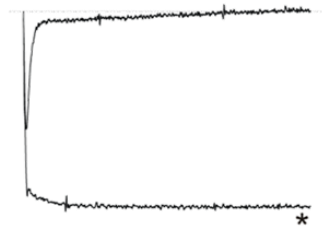
Na<sub>v</sub>1.7



Na<sub>v</sub>1.8



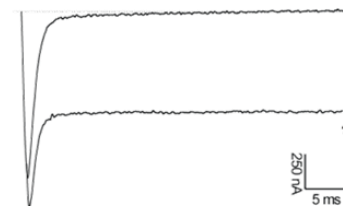
DmNa<sub>v</sub>1



BgNa<sub>v</sub>1

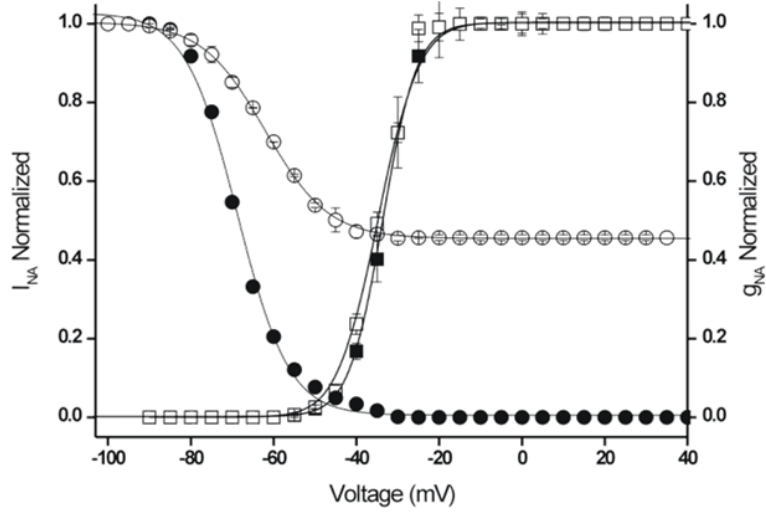


VdNa<sub>v</sub>1

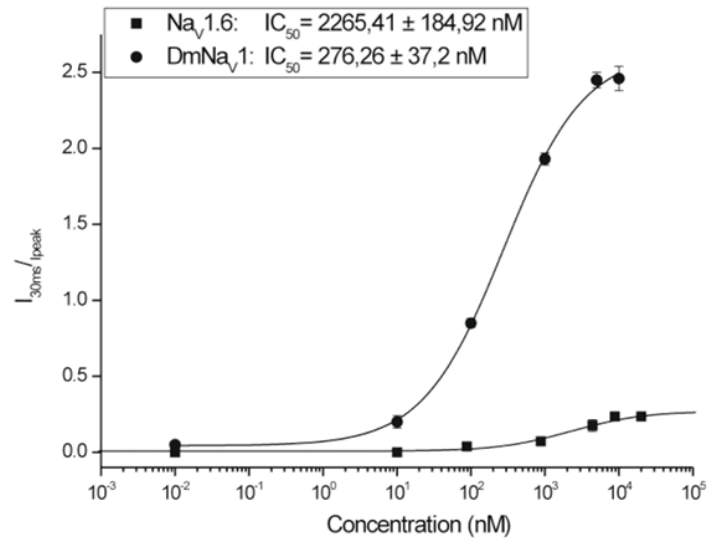
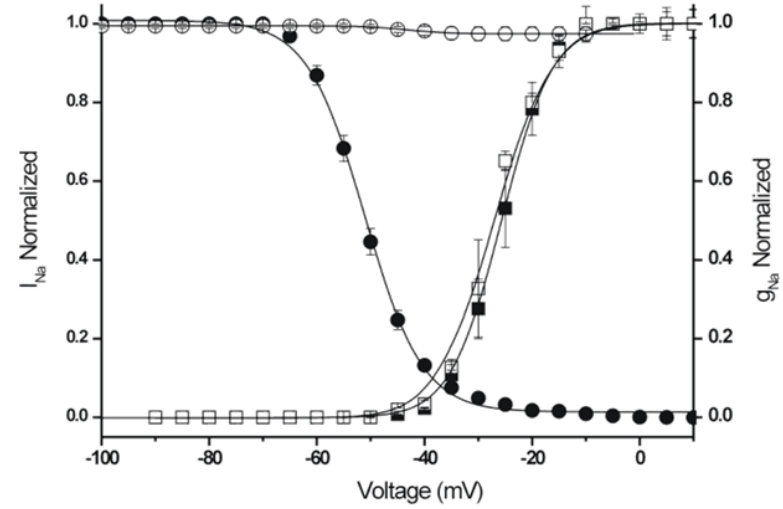


# APETx3

## Na<sub>v</sub>1.6



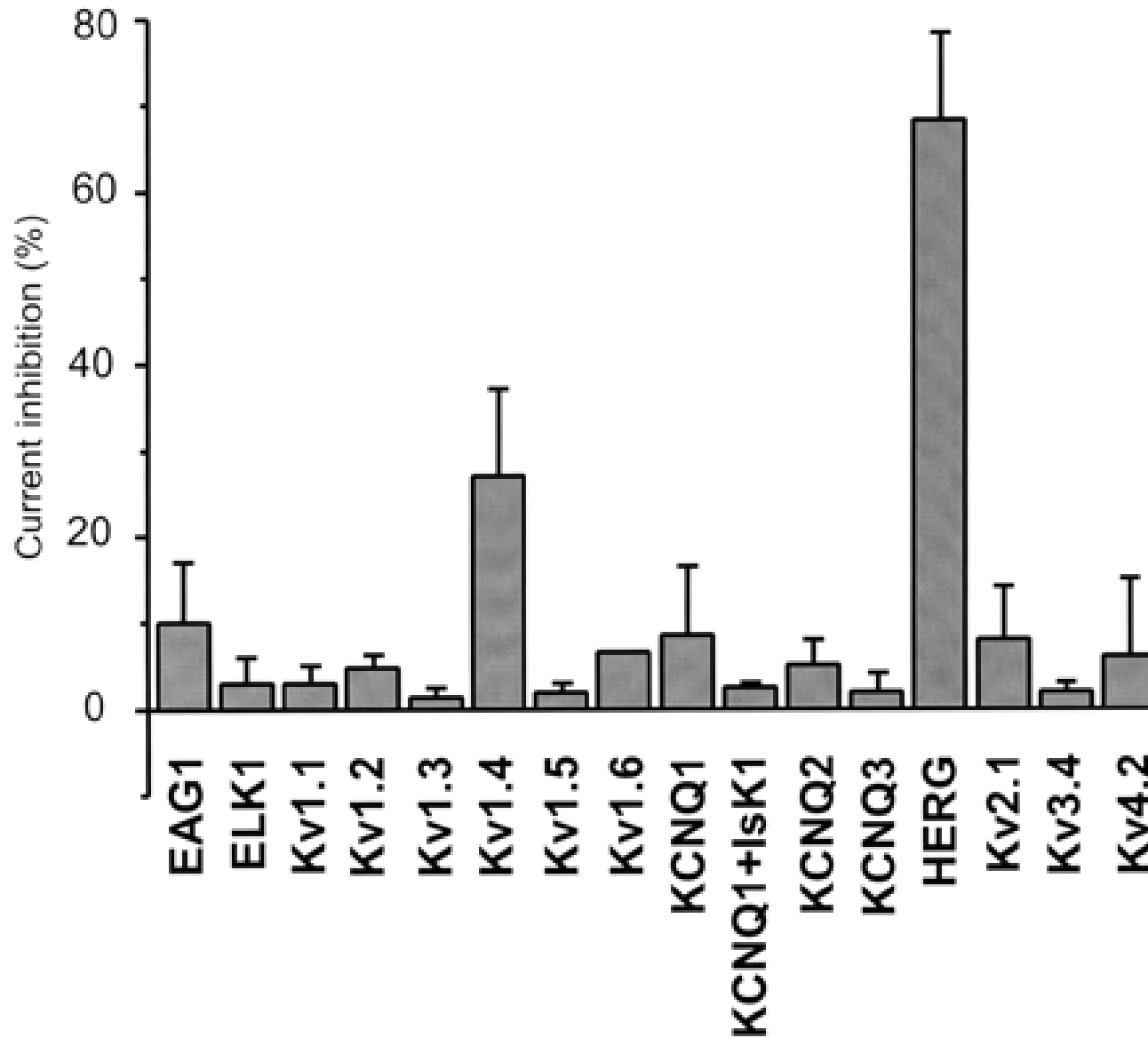
## DmNa<sub>v</sub>1



# Target promiscuity of sea anemone peptides

APET <sub>x3</sub>	G	T	P	C	Y	C	G	K	T	I	G	I	Y	W	F	G	T	K	T	C	P	S	N	R	G	Y	T	G	S	C	G	Y	F	L	G	I	C	C	Y	P	V	D
APET <sub>x1</sub>	G	T	P	C	Y	C	G	K	T	I	G	I	Y	W	F	G	T	K	T	C	P	S	N	R	G	Y	T	G	S	C	G	Y	F	L	G	I	C	C	Y	P	V	D
APET <sub>x2</sub>	G	T	A	C	S	C	G	N	S	K	G	I	Y	W	F	Y	R	P	S	C	P	T	D	R	G	Y	T	G	S	C	R	Y	F	L	G	T	C	C	T	P	A	D

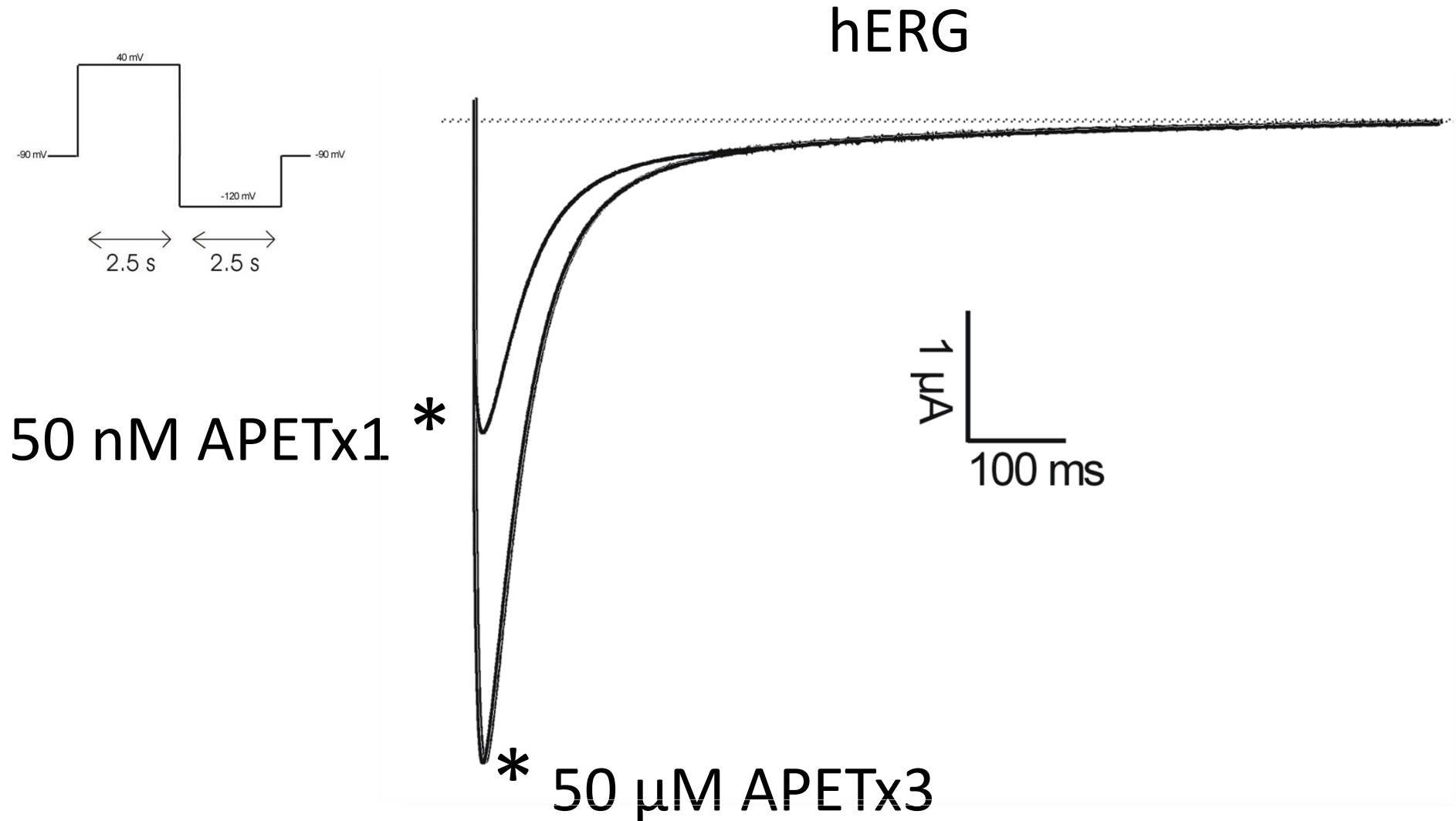
# APETx1



hERG:  $EC_{50} = 34$  nM

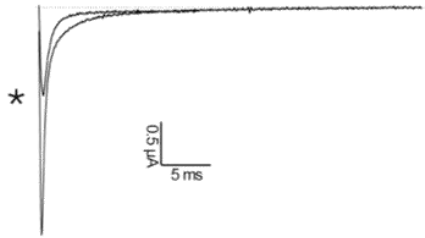
(Diocot *et al.*, 2003)

# Target promiscuity of sea anemone peptides

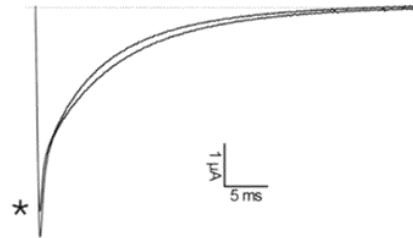


# APETx1

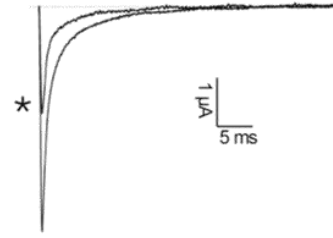
Na<sub>v</sub>1.2



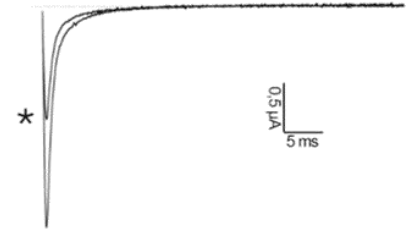
Na<sub>v</sub>1.3



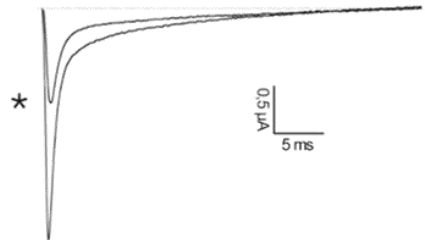
Na<sub>v</sub>1.4



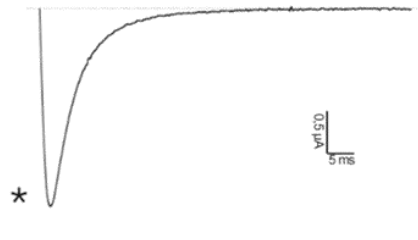
Na<sub>v</sub>1.5



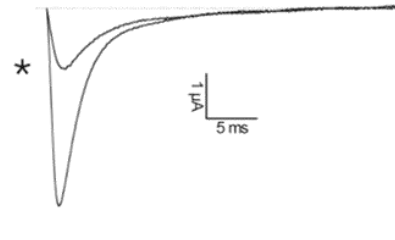
Na<sub>v</sub>1.6



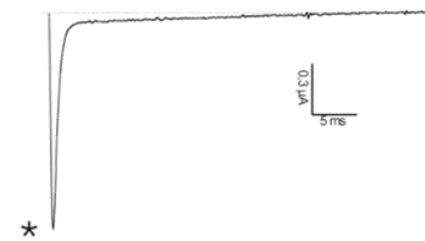
Na<sub>v</sub>1.7



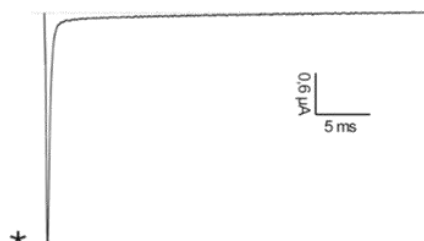
Na<sub>v</sub>1.8



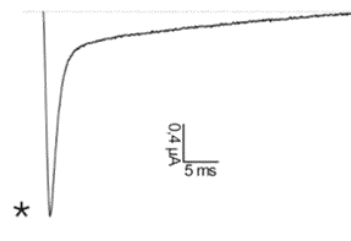
DmNa<sub>v</sub>1



BgNa<sub>v</sub>1

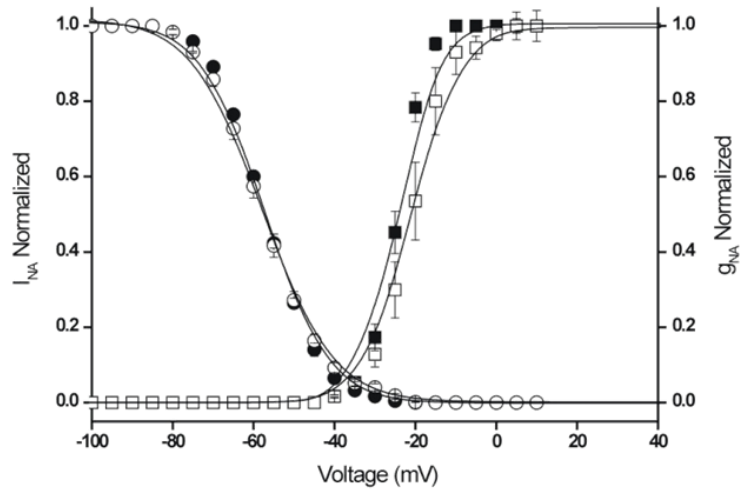


VdNa<sub>v</sub>1

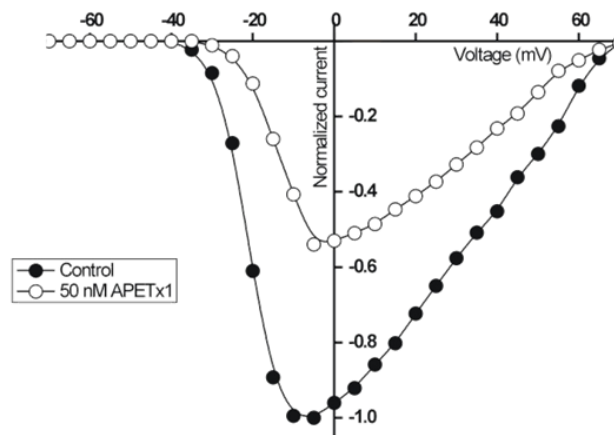


# APETx1

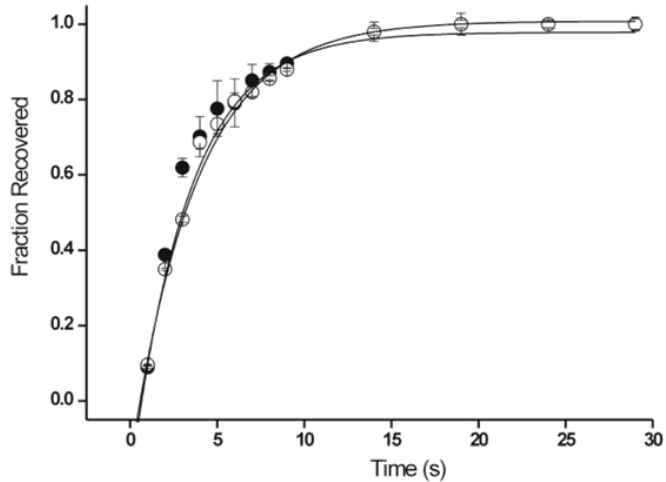
A



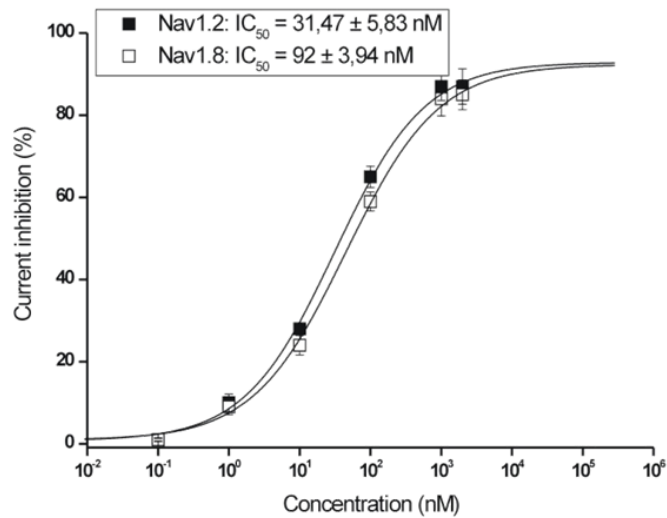
B



C

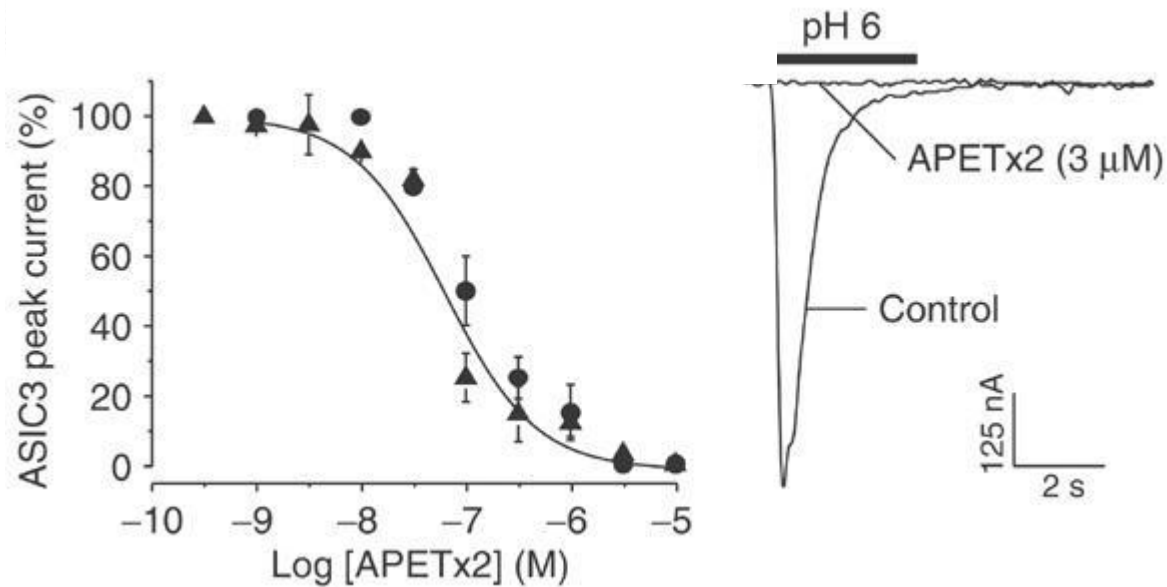


D





# APETx2

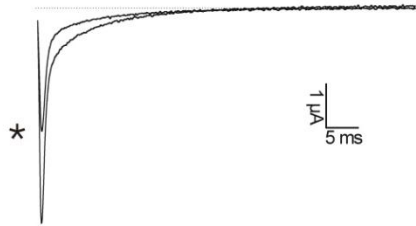


- Inhibits ASIC channels
  - ASIC3:  $IC_{50} = 63 \text{ nM}$
- *in vivo* studies
  - ASIC3: involvement in inflammatory and postoperative pain

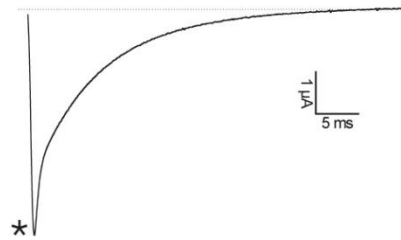
(Diocot *et al.*, 2004)

# APETx2

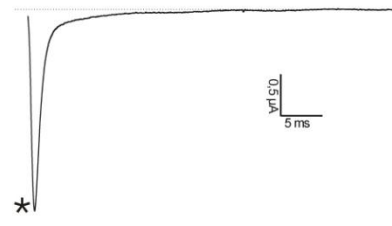
Na<sub>v</sub>1.2



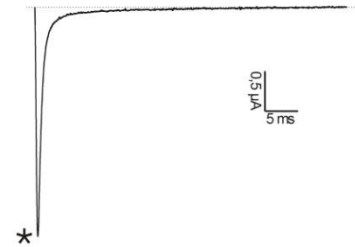
Na<sub>v</sub>1.3



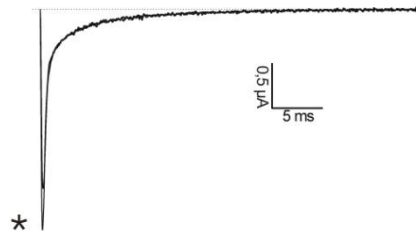
Na<sub>v</sub>1.4



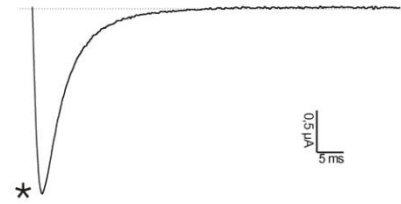
Na<sub>v</sub>1.5



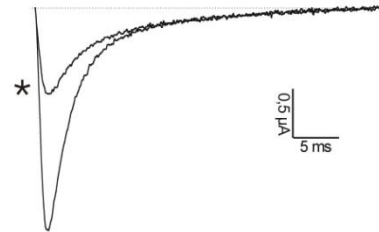
Na<sub>v</sub>1.6



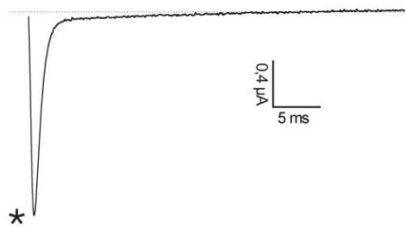
Na<sub>v</sub>1.7



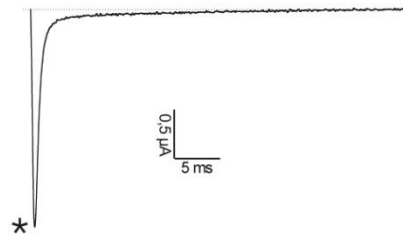
Na<sub>v</sub>1.8



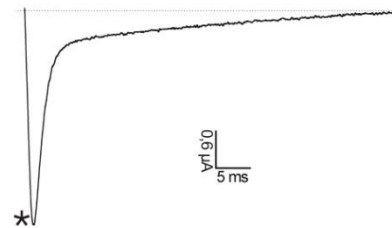
DmNa<sub>v</sub>1



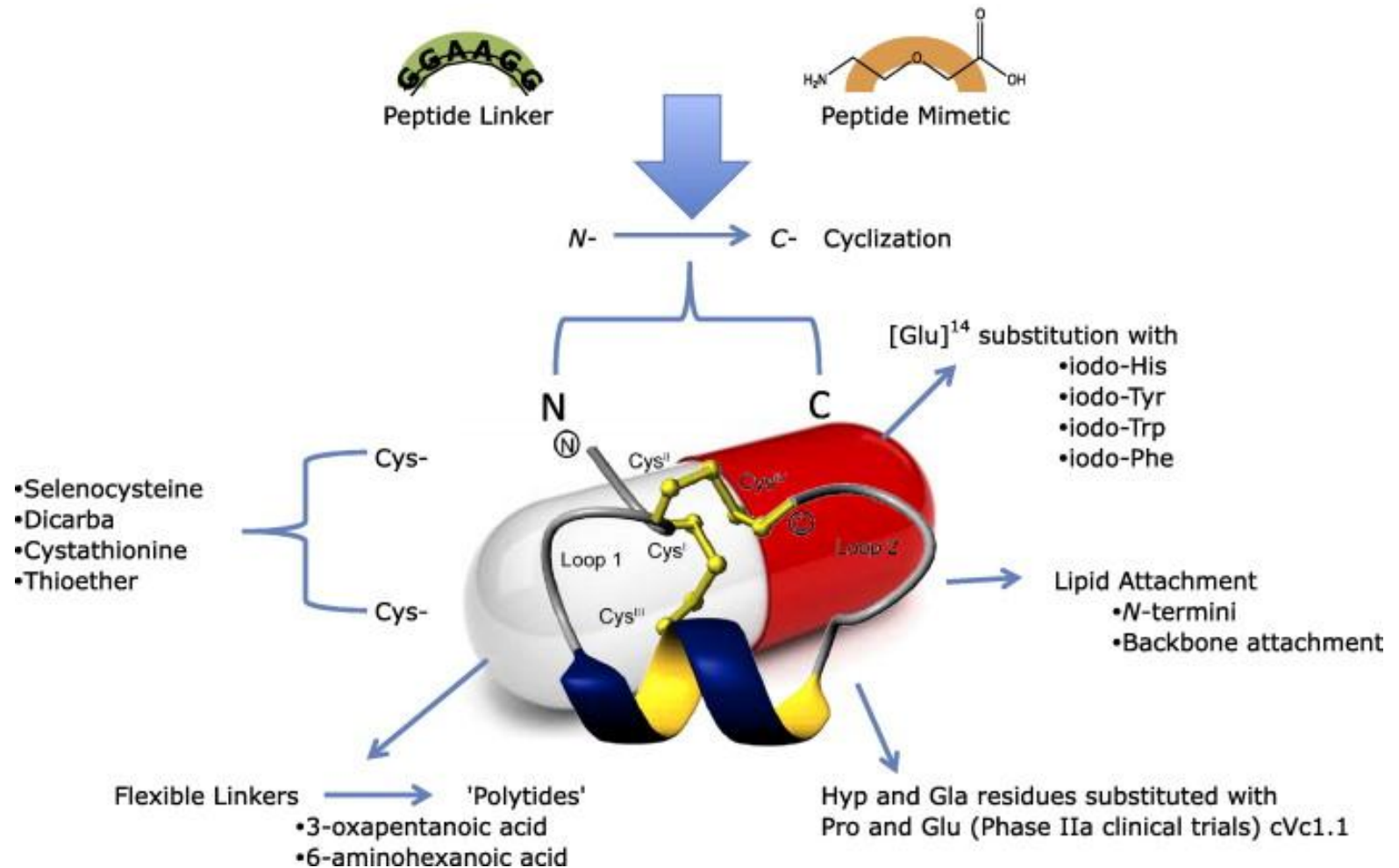
BgNa<sub>v</sub>1



VdNa<sub>v</sub>1



# Marine Biotechnology



# Sea anemones & you: thank you!

