

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)  
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук  
(ИБХ РАН)

*На правах рукописи*

Гиголаев Андрей Михайлович

«Молекулярные основы селективности пептидных поровых блокаторов  
калиевых каналов»

Специальность – 1.4.9 – Биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва, 2023 г.

Работа выполнена в лаборатории молекулярных инструментов для нейробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Научный руководитель – *Василевский Александр Александрович, кандидат химических наук,*

Официальные оппоненты: *Шайтан Алексей Константинович, доктор физико-математических наук, член-корреспондент Российской академии наук, доцент кафедры биоинженерии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова*

*Амахин Дмитрий Валерьевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук*

Ведущая организация – *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук*

Защита состоится 6 декабря 2023 г. в 11 ч 00 мин. на заседании Диссертационного совета 24.1.037.01 Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ИБХ РАН ([www.ibch.ru](http://www.ibch.ru)).

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 2023 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного  
совета



д.ф.-м.н. В.А. Олейников

## Общая характеристика работы

### Актуальность работы

Потенциал-чувствительные калиевые каналы ( $K_V$ -каналы) являются самой большой группой ионных каналов; у человека насчитывается 40 генов, кодирующих основную  $\alpha$ -субъединицу. Зрелый канал состоит из четырех  $\alpha$ -субъединиц, а также может включать в свой состав четыре вспомогательные  $\beta$ -субъединицы. Каждая  $\alpha$ -субъединица состоит из трансмембранной и цитоплазматической частей. Трансмембранная часть, в свою очередь, состоит из шести трансмембранных сегментов (S1–S6; Рис. 1). Сегменты S1–S4 формируют потенциал-чувствительный домен, который отвечает за реагирование канала на изменение мембранного потенциала. Сегменты S5 и S6 от всех четырех  $\alpha$ -субъединиц образуют общий поровый домен, который формирует собственно пору канала.

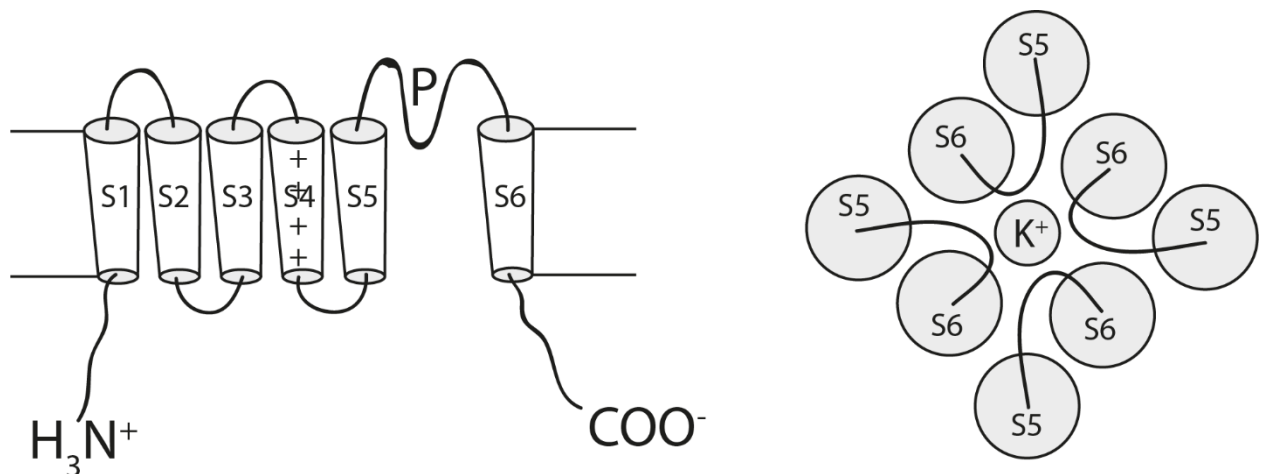


Рисунок 1. Схема строения  $K_V$ -каналов. Слева представлена диаграмма  $\alpha$ -субъединицы. В сегменте S4 (сенсоре потенциала) отмечены положительные заряды. P — поровая петля. Справа изображена пора канала, вид с внеклеточной стороны.

$K_V$ -каналы являются важными участниками различных физиологических процессов, в частности: передача потенциала действия, регуляция клеточного объема, иммунного ответа, клеточного цикла и апоптоза. Подсемейство  $K_V1$ -каналов, или Shaker-подобных каналов млекопитающих, содержащее восемь изоформ, представляет интерес как объект исследования, поскольку, помимо выполняемых физиологических функций, с ними ассоциированы различные заболевания. Так, мутации в генах каналов  $K_V1.1$ ,  $1.2$  и  $1.6$  могут приводить к атаксии и эпилепсии. Канал  $K_V1.3$  экспрессируется не только в нервной ткани,

но еще и на поверхности Т-лимфоцитов, а его гиперэкспрессия приводит к аутоиммунным, воспалительным и онкологическим заболеваниям.

Для изучения  $K_v$ -каналов в норме и патологии необходимы селективные лиганды, которые способны узнавать отдельные изоформы. Примером таких соединений являются токсины из яда скорпионов, в частности пептидные поровые блокаторы  $K_v$ -каналов. В настоящее время уже существует ряд селективных лигандов, однако зачастую природа их специфичности неизвестна. Поиск детерминант селективности представляет актуальную задачу для разработки новых лигандов  $K_v$ -каналов.

### Цель и задачи исследования

Цель: сконструировать и получить селективные лиганды потенциал-чувствительных калиевых каналов  $K_v1$  и определить детерминанты их селективности.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Построить молекулярные модели взаимодействия пептидных поровых блокаторов с потенциал-чувствительными калиевыми каналами. Провести анализ моделей и предложить модификации в структуру блокаторов с целью увеличения их селективности.
2. Получить рекомбинантные пептиды с предложенными модификациями в бактериальной системе экспрессии.
3. Провести анализ полученных пептидов на потенциал-чувствительных калиевых каналах методами электрофизиологии.
4. Определить детерминанты селективности пептидов по отношению к отдельным изоформам калиевых каналов.

### Научная новизна и практическая значимость работы

Ранее при последовательном хроматографическом разделении яда скорпиона *Mesobuthus eupeus* были обнаружены токсины MeKTx11-1 и 3, которые проявляли селективность к каналу  $K_v1.2$ , но в разной степени. Молекулярное моделирование, проведенное нами, позволило пояснить, почему эти два токсина, различающиеся всего двумя аминокислотными остатками (а.о.), по-разному действуют на канал  $K_v1.2$ . Далее мы использовали компьютерный эксперимент не просто для объяснения наблюдаемой

селективности блокаторов, а и для предсказания необходимых аминокислотных замен для изменения селективности пептидов.

Мы использовали два подхода. Во-первых, с помощью мутагенеза известных токсинов скорпионов MeKTx13-3 и харибдотоксина (ChTx) были получены селективные лиганды каналов  $K_v1.1-1.3$ . Во-вторых, на основе пептида из пшеницы, не проявляющего активность в отношении  $K_v1$ -каналов, были получены селективные блокаторы  $K_v1.3$  и  $1.6$ .

Наши данные показывают, что в большинстве случаев искомой селективности удается добиться путем увеличения количества контактов между пептидом и целевым каналом. Однако иногда замены могут приводить к неожиданному эффекту, когда конформация пептида изменяется, и происходит перераспределение контактов. Мы считаем, что для достижения наилучшего результата перед получением рекомбинантных пептидов и их тестированием необходимо провести один или несколько раундов моделирования комплексов с использованием молекулярной динамики (МД).

Полученные нами селективные лиганды каналов  $K_v1.1-1.3$  и  $1.6$  могут быть использованы как молекулярные инструменты исследования этих белков в норме и патологии. В частности, с их помощью можно изучить биологическую функцию каналов, селективно блокируя выбранную изоформу. Флуоресцентно-меченые аналоги селективных лигандов позволят визуализировать изучаемые каналы в биологических образцах, локализовать их в тканях организма. Кроме того, полученные нами пептиды могут служить основой для разработки новых лекарственных средств для терапии заболеваний, фармакологической мишенью при которых являются  $K_v1$ -каналы.

#### Личный вклад автора

Диссертант лично провел бóльшую часть работ по получению рекомбинантных пептидов, участвовал в электрофизиологических экспериментах и анализе данных молекулярного моделирования, а также подготовке статей к публикации.

#### Апробация работы и научные публикации

Работа прошла апробацию на открытом семинаре отдела молекулярной нейробиологии ИБХ РАН. Результаты работы изложены в шести статьях, опубликованных в рецензируемых журналах, и представлены на четырех конференциях.

## Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 122 страницах, содержит 36 рисунков и 15 таблиц, имеет традиционную структуру и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, список литературы, состоящий из 192 источников, и приложение.

## Общее содержание работы

Для того, чтобы изучать  $K_v$ -каналы, необходимы селективные лиганды, способные распознавать их отдельные изоформы. Есть несколько способов получения таких лигандов, но мы остановились на трех из них. Первый способ — это поиск перспективных соединений в природных источниках. В нашем случае таким источником является яд скорпионов, он богат различными полипептидными токсинами. Некоторые из них блокируют  $K_v$ -каналы и представляют собой пептиды длиной  $\approx 30$ – $40$  а.о. с укладкой типа дисульфид-стабилизированных  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -слоя ( $CS\alpha/\beta$ ) и тремя дисульфидными связями (порядок:  $C^1$ – $C^4$ ,  $C^2$ – $C^5$ ,  $C^3$ – $C^6$ ). Последовательной очисткой с использованием методов хроматографии можно добиться получения токсинов в индивидуальном состоянии, которые затем можно исследовать различными методами, в частности электрофизиологии. Второй способ — получение селективных лигандов на основе уже известных токсинов при помощи мутагенеза. В этом случае мутации могут быть предложены путем моделирования или сравнения аминокислотных последовательностей или пространственных структур. Такие пептиды можно получать в системах экспрессии и затем также исследовать методами электрофизиологии. Третий способ — получение активных лигандов на основе каких-либо неактивных молекул, используемых в качестве каркаса. В этом случае можно применять методы предсказания аминокислотных замен для придания таким каркасам искомых свойств. Модели строились В.М. Табакмахером (лаборатория моделирования биомолекулярных систем и группа анализа структуры мембранных белков *in silico* ИБХ РАН) и анализировались совместно. Активность токсинов изучалась в лаборатории токсикологии и фармакологии Католического университета г. Лёвен (Бельгия) при непосредственном участии диссертанта.

## Изучение селективности токсинов MeKTx11-1 и 3 из яда скорпиона *Mesobuthus eupeus*

Ранее в результате хроматографического разделения яда скорпиона *M. eupeus* были получены токсины, названные MeKTx11-1 и 3. Они проявляли селективность к изоформе Kv1.2, но в разной степени, при том, что отличаются всего двумя а.о. Для установления причин различий в аффинности, мы решили получить производные этих токсинов. О.В. Некрасовой (лаборатория инженерии белка ИБХ РАН) были наработаны рекомбинантные MeKTx11-1 и 3, а также их мутанты MeKTx11-1\_G9V и MeKTx11-1\_P37S (Рис. 2).

MeKTx11-1 был протестирован на широкой панели ионных каналов, экспрессированных в ооцитах *Xenopus laevis*, методом двухэлектродной фиксации потенциала (Рис. 3, Табл. 1): Kv (rKv1.1, rKv1.2, hKv1.3, rKv1.4, rKv1.5, rKv1.6, hKv2.1, hKv3.1, rKv4.2 и hKv11.1), потенциал-чувствительных натриевых каналах (Nav: rNav1.1, rNav1.2, rNav1.4, hNav1.5 и BgNav1) и потенциал-чувствительном кальциевом канале Cav3.3. В результате оказалось, что токсин в концентрации 1 мкМ действует только на каналы Kv1.1, 1.2, 1.3 и 1.6, поэтому дальнейшие эксперименты велись на этих изоформах. Полумаксимальные ингибирующие концентрации (ИК<sub>50</sub>) рекомбинантных токсинов MeKTx11-1 и 3 были идентичны значениям для природных токсинов. В концентрации 200 пМ токсин MeKTx11-1 вызывал ингибирование тока, опосредованного Kv1.2, на 53 ± 2%. Вольт-амперная характеристика каналов в контроле и в присутствии токсина не отличалась. Это говорит о том, что механизм действия MeKTx11-1 состоит в блокировании поры канала, а не воздействии на сенсор потенциала.

	1	10	20	30	37																																
MeKTx11-1	Z	F	T	D	V	K	C	T	G	T	K	Q	C	W	P	V	C	K	M	F	G	R	P	N	G	<b>K</b>	C	M	N	G	K	C	R	C	Y	P	
MeKTx11-3	Z	F	T	D	V	K	C	T	V	T	K	Q	C	W	P	V	C	K	M	F	G	R	P	N	G	<b>K</b>	C	M	N	G	K	C	R	C	Y	S	
MeKTx11-1_G9V	Z	F	T	D	V	K	C	T	V	T	K	Q	C	W	P	V	C	K	M	F	G	R	P	N	G	<b>K</b>	C	M	N	G	K	C	R	C	Y	P	
MeKTx11-1_P37S	Z	F	T	D	V	K	C	T	G	T	K	Q	C	W	P	V	C	K	M	F	G	R	P	N	G	<b>K</b>	C	M	N	G	K	C	R	C	Y	S	
ChTx	Z	F	T	N	V	S	C	T	T	S	K	E	C	W	S	V	C	Q	R	L	H	N	T	S	R	<b>G</b>	<b>K</b>	C	M	N	K	K	C	R	C	Y	S

Рисунок 2. Сравнение аминокислотных последовательностей пептидов MeKTx11-1, MeKTx11-3, MeKTx11-1\_G9V, MeKTx11-1\_P37S и ChTx. А.о., отличающиеся от MeKTx11-1, показаны на темно-сером фоне. Остатки цистеина показаны на сером фоне. Остаток лизина, блокирующий пору Kv-канала, выделен жирным шрифтом. Z обозначает остаток пироглутаминовой кислоты. Нумерация а.о. приведена над последовательностями.

Таблица 1. Значения  $IK_{50}$ , рассчитанные для токсинов MeKTx11-1 и 3 и их производных по отношению к  $K_V$ -каналам.

Пептид	$IK_{50}$ , нМ			
	$K_V1.1$	$K_V1.2$	$K_V1.3$	$K_V1.6$
MeKTx11-1	$2110 \pm 150$	$0,19 \pm 0,01$	$67 \pm 5$	$8900 \pm 900$
MeKTx11-3	$130 \pm 10$	$3,1 \pm 0,2$	$78 \pm 11$	$910 \pm 110$
MeKTx11-1_G9V	$1380 \pm 60$	$0,07 \pm 0,01$	$1,4 \pm 0,2$	$6900 \pm 900$
MeKTx11-1_P37S	$740 \pm 80$	$0,09 \pm 0,01$	$13,6 \pm 1,1$	$6000 \pm 900$

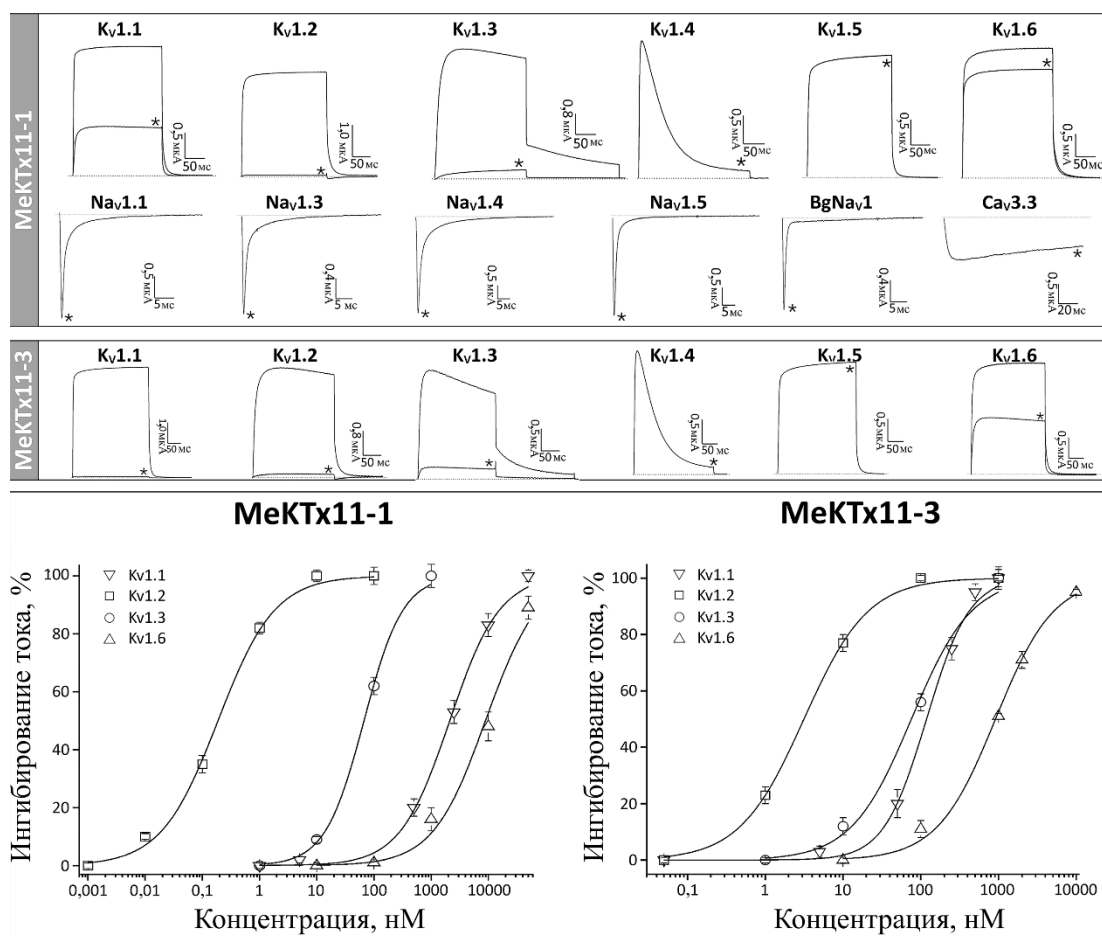


Рисунок 3. Активность MeKTx11-1 и 3 по отношению к ионным каналам. Вверху представлены записи токов через каналы  $K_V1.1-1.6$ ,  $Na_V$  и  $Ca_V$  в контроле и после аппликации 1 мкМ токсина (обозначены звездочками). Кривые зависимости блока тока через  $K_V$ -каналы от концентрации токсина показаны ниже. Здесь и далее усы показывают стандартную ошибку среднего ( $n = 5$ ). Анализ проводился при помощи уравнения Хилла.

Модели комплексов токсинов MeKTx11-1 и 3 с каналами  $K_V1.2$  и  $1.3$  были построены на основе известной структуры комплекса ChTx с химерным каналом  $K_V1.2/2.1$  (PDB ID: 4JTA). Для моделирования MeKTx11-1 и 3 был выбран гомолог с известной



структурой — ChTx (PDB ID: 2CRD). Химерный канал заменяли на Kv1.3, а ChTx — на MeKTx11-1 и 3 при помощи гомологичного моделирования. Затем все комплексы токсинов с каналами были помещены в модель фрагмента мембраны определенного состава, разработанную для имитации мембран нейронов в лаборатории моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН. После этого системы подвергали МД (длина траектории 100 нс). Все эксперименты МД были выполнены с помощью программного обеспечения GROMACS, набора параметров AMBER99SB-ILDN. Моделирование проводили с временным шагом 2 фс, с использованием трехмерных периодических граничных условий, в изотермическом-изобарическом ансамбле с полуизотропным давлением 1 бар и при температуре 37°C.

Анализ траекторий МД показал, что хотя оба токсина в комплексе с каналами имеют сходную ориентацию, они образуют несколько специфических долгоживущих (время жизни более 50% длины траектории) и среднеживущих (10–50% длины траектории) контактов с Kv1.2, которые отсутствуют в случае Kv1.3. А именно, основная цепь P24 и боковая цепь N25 образуют водородные связи с боковой цепью Q353 в Kv1.2. В комплексе с Kv1.3 G380 занимает то же положение, что Q353 в канале Kv1.2, а так как глицин не имеет боковой цепи, то и не может образовывать специфические контакты с а.о. токсина. Помимо этого, можно обнаружить различия в том, как MeKTx11-1 и 3 взаимодействуют с каналом Kv1.2. Боковая цепь K11 пептидов MeKTx11-1 и MeKTx11-1\_P37S образует водородную связь с основной цепью остатка Q353 в комплексе с каналом Kv1.2. Эта связь отсутствует в комплексах MeKTx11-3—rKv1.2 или MeKTx11-1\_G9V—rKv1.2. Это происходит из-за наличия объемной боковой цепи остатка V9, которая загораживает остаток Q353 канала Kv1.2, предотвращая его взаимодействие с K11 пептида (Рис. 4).

MeKTx11-1 и 3 относятся к подсемейству  $\alpha$ -КТх1 и являются его первыми представителями с ярко выраженной Kv1.2-селективностью. Эта изоформа канала связана с рядом неврологических заболеваний, поэтому MeKTx11-1 и 3 могут найти применение в рациональном дизайне лекарств. Однако их полезность ограничена нарушениями, связанными с мутациями, которые приводят к увеличению активности каналов. Другим ограничением нашего исследования является то, что мы тестировали активность токсинов только против гомомерных Kv, однако гетеромерные каналы намного чаще экспрессируются *in vivo*, включая каналы, содержащие субъединицу Kv1.2.

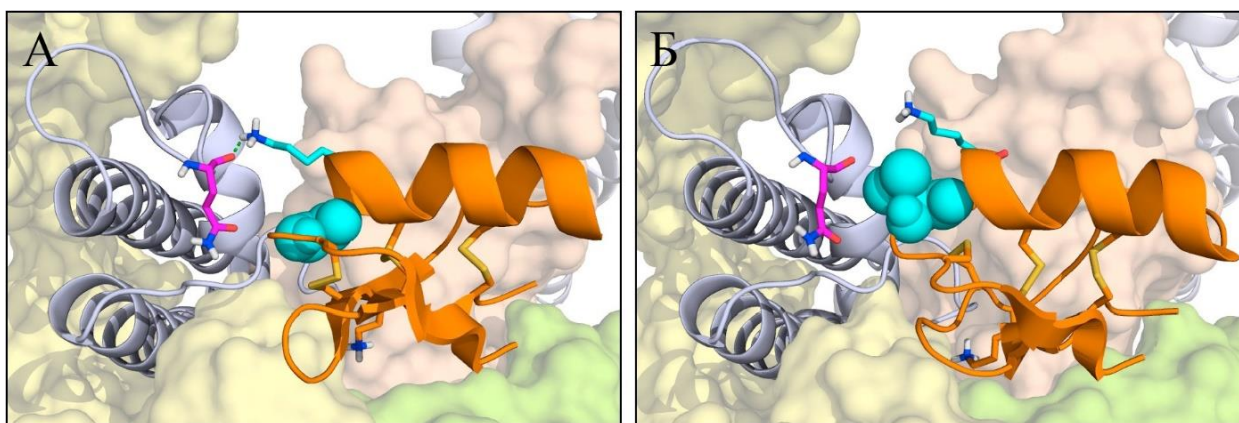


Рисунок 4. Модель комплексов  $rKv1.2$  с MeKTx11-1 (А) и MeKTx11-3 (Б) после 100 нс МД. Токсины показаны в виде ленточной структуры оранжевого цвета; дисульфидные мостики (желтые) и ключевой остаток лизина (K27) показаны в виде стержневой модели. Для наглядности три субъединицы канала на заднем плане показаны как молекулярная поверхность, окрашенная в светло-желтый, светло-зеленый и бежевый цвета. Субъединица, образующая различающиеся взаимодействия с токсинами, показана серебристой ленточной структурой. Остатки K11 токсина и Q353 канала, вовлеченные в специфические межмолекулярные контакты в комплексе MeKTx11-1— $rKv1.2$ , и они же в MeKTx11-3— $rKv1.2$  показаны в виде стержневой модели (голубого и розового цвета соответственно). Голубые сферы показывают G9 в структуре MeKTx11-1 и V9 в структуре MeKTx11-3. Зеленая пунктирная линия обозначает водородную связь.

Получение селективных лигандов на основе уже известных токсинов

#### *Производные токсина MeKTx13-3*

Токсин MeKTx13-3 из яда скорпиона *M. eurus* проявляет сходную высокую аффинность к каналам  $Kv1.1$  и  $1.3$  (Табл. 2). Мы решили получить на его основе  $Kv1.3$ -селективный блокатор. По аминокислотной последовательности MeKTx13-3 идентичен VmKTX, выделенному из *Olivierus martensii*, близкого родственника *M. eurus*. Поскольку трехмерная структура VmKTX известна (PDB ID: 1BKT), мы использовали ее для моделирования комплексов MeKTx13-3 с каналами  $Kv1.1$ – $1.3$ . Затем модели подвергались МД (Рис. 5). Чтобы выявить различия во взаимодействии MeKTx13-3 с изоформами  $Kv$ , мы проанализировали межмолекулярные контакты и вклад отдельных а.о. в энергию образования комплекса во время МД с использованием программного пакета IMPULSE, разработанного в лаборатории моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН.

Фармакологическая характеристика и подробный анализ структуры комплексов позволили нам предложить несколько точечных замен в MeKTx13-3 для переключения селективности токсина. Поскольку Q12, K15 и K18 образуют водородные связи, солевые мостики и  $\pi$ -катионные взаимодействия в комплексах с Kv1.1 и 1.2, общая идея модификаций заключалась в том, чтобы уменьшить количество полярных контактов. Более того, поскольку эти а.о. токсина не образуют специфических контактов с Kv1.3, разумно предположить, что такие модификации не окажут существенного влияния на сродство к этой изоформе канала. Поэтому мы предложили производное MeKTx13-3, в котором Q12, K15 и K18 заменены на аланин для снижения сродства токсина к Kv1.1 и 1.2. Кроме того, мы заменили D33 на аргинин для повышения его сродства к Kv за счет образования новых контактов с остатками D377/375/399 в Kv1.1/1.2/1.3 (Рис. 5).

Анализ литературных данных по мутагенезу VmKTX позволил нам предложить другие модификации. Так, замена D33H в последовательности VmKTX приводит к увеличению активности по отношению к каналу Kv1.3. Производное VmKTX, названное ADWX-1, содержит остатки R11 и H33 и блокирует Kv в субнанолярных концентрациях. Замена этих а.о. (R11A или H33A) приводит к падению активности. Среди других токсинов, которые имеют остатки R11, M28, R30 и H33, также были найдены высокоэффективные блокаторы Kv1.3. Мы решили внести соответствующие четыре замены в структуру MeKTx13-3 (G11R, I28M, G30R и D33H), ожидая получить при этом высокоселективный блокатор Kv1.3.

Пептиды с предложенными заменами, названные MeKTx13-3\_AAAR и MeKTx13-3\_RMRH, были получены в бактериальной системе экспрессии (Рис. 6). Гены, кодирующие MeKTx13-3 и его производные, были клонированы в экспрессионный вектор pET-32b. В клетках *Escherichia coli* SHuffle T7 Express были наработаны гибридные белки, которые помимо целевых пептидов содержали белок-помощник тиоредоксин (Trx). Искомые пептиды получали при помощи гидролиза гибридных белков легкой цепью энтеропептидазы человека и разделения гидролизата методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) в градиенте концентрации ацетонитрила. Чистоту выделенных пептидов проверяли при помощи аналитической ОФ-ВЭЖХ. Целевой продукт идентифицировали путем измерения молекулярных масс фракций методом матрично-активированной лазерной десорбции-ионизации (МАЛДИ) масс-спектрометрии. Выход разных пептидов, полученных нами в работе, составил 2–10 мг с литра питательной среды.

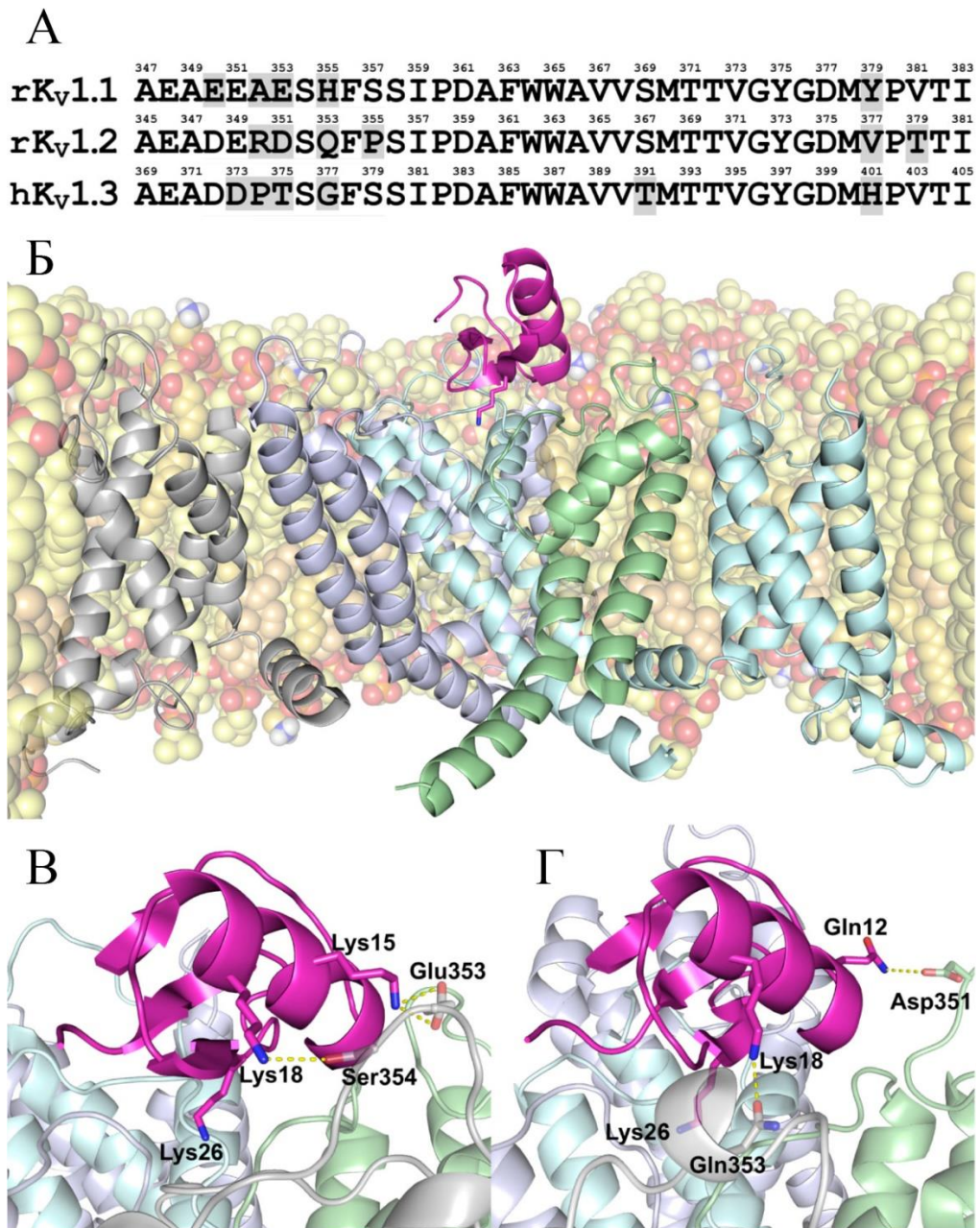


Рисунок 5. (А) Сравнение аминокислотных последовательностей области вестибуля поры каналов K<sub>V</sub>1.1–1.3. Нумерация а.о. приведена над каждой последовательностью; отличающиеся а.о. показаны на сером фоне. (Б–Г) Модель комплекса MeKTx13-3 с каналами K<sub>V</sub>1.1–1.3. (Б) Общая структура комплекса MeKTx13-3—K<sub>V</sub>1.3 после 100 нс МД внутри липидной бислоевой мембраны. MeKTx13-3 окрашен розовым; остаток K26 (блокирующий пору канала) показан в виде стержневой модели. (В, Г) Крупный план области вестибуля поры канала в комплексах MeKTx13-3—K<sub>V</sub>1.1 (В) и MeKTx13-3—K<sub>V</sub>1.2 (Г). Каналы показаны в полупрозрачном представлении. K26 и а.о., участвующие в межмолекулярных контактах, отсутствующих в комплексе MeKTx13-3—K<sub>V</sub>1.3, показаны стержневой моделью. Водородные связи и солевые мостики обозначены пунктирными желтыми линиями. Липиды не показаны для наглядности.

Сначала мы сравнили активность природного и рекомбинантного MeKTx13-3 на Kv1.1. Рекомбинантный пептид был менее активен, чем нативный токсин (значения ИК<sub>50</sub> составили  $6,7 \pm 2,7$  и  $1,9 \pm 0,2$  нМ соответственно), что, вероятно, связано с отсутствием у первого С-концевого амидирования. Снижение активности, однако, небольшое, и мы решили использовать рекомбинантный пептид MeKTx13-3 без амидирования в дальнейших исследованиях.

Мы построили кривые доза-ответ для чувствительных каналов (Рис. 7; Табл. 2). MeKTx13-3\_AAAR продемонстрировал сравнимую с нативным MeKTx13-3 активность в отношении Kv1.3 (ИК<sub>50</sub> =  $8,9 \pm 0,9$  нМ для природного токсина и  $9,1 \pm 0,4$  нМ для мутанта), тогда как его сродство к Kv1.1 резко снизилось (ИК<sub>50</sub> =  $541,5 \pm 48,6$  нМ вместо  $1,9 \pm 0,2$  нМ для природного MeKTx13-3). MeKTx13-3\_AAAR также показал сниженную активность в отношении Kv1.2 (ИК<sub>50</sub> =  $208,2 \pm 15,2$  нМ по сравнению с  $105,9 \pm 14,6$  нМ для MeKTx13-3) и Kv1.6 (ИК<sub>50</sub> =  $1522,3 \pm 183,4$  нМ вместо  $63,4 \pm 4,5$  нМ). MeKTx13-3\_RMRH, вопреки ожиданиям, показал увеличенную аффинность к Kv1.1 и 1.2, ИК<sub>50</sub> составили  $0,11 \pm 0,02$ ,  $10,7 \pm 0,8$ ,  $8,1 \pm 0,2$  и  $16,3 \pm 1,0$  нМ для Kv1.1, 1.2, 1.3 и 1.6 соответственно. Можно увидеть смещение кривых вправо для MeKTx13-3\_AAAR, а для MeKTx13-3\_RMRH наблюдается смещение кривой для Kv1.1 влево, тем самым показывая изменение селективности полученных пептидов. Как мы и предполагали, MeKTx13-3\_AAAR из-за внесенных замен сменил свою селективность с Kv1.1 на 1.3. Это произошло благодаря тому, что замены привели к исчезновению нескольких контактов между пептидом и каналами Kv1.1 и 1.2. В случае же MeKTx13-3\_RMRH мы ожидали, что он тоже будет селективным к Kv1.3. Для поиска причин, по которым он стал селективным к Kv1.1, мы вновь обратились к молекулярному моделированию.

Структуру пептида мы моделировали также на основе VmKTx. Замена D33N в MeKTx13-3\_RMRH нивелирует неблагоприятный энергетический вклад, который был обусловлен отталкиванием двух отрицательно заряженных а.о. в комплексе с Kv1.1. Кроме того, H33 образует водородную связь с остатком G376. Таким образом, преимущества замены D33N для стабилизации комплекса MeKTx13-3\_RMRH—Kv1.1 несомненны. Однако маловероятно, что этот а.о. является ключевым для увеличения специфичности к Kv1.1, наблюдаемой у MeKTx13-3\_RMRH, поскольку (а) H9 образует две водородные связи с Kv1.2, что может вносить вклад в увеличение сродства к этому каналу; (б) замена D33R в MeKTx13-3\_AAAR (привносит благоприятный вклад в энергию взаимодействия и обеспечивает множество возможностей для образования полярных контактов) не предотвратила уменьшение сродства к Kv1.1, вызванное другими заменами.

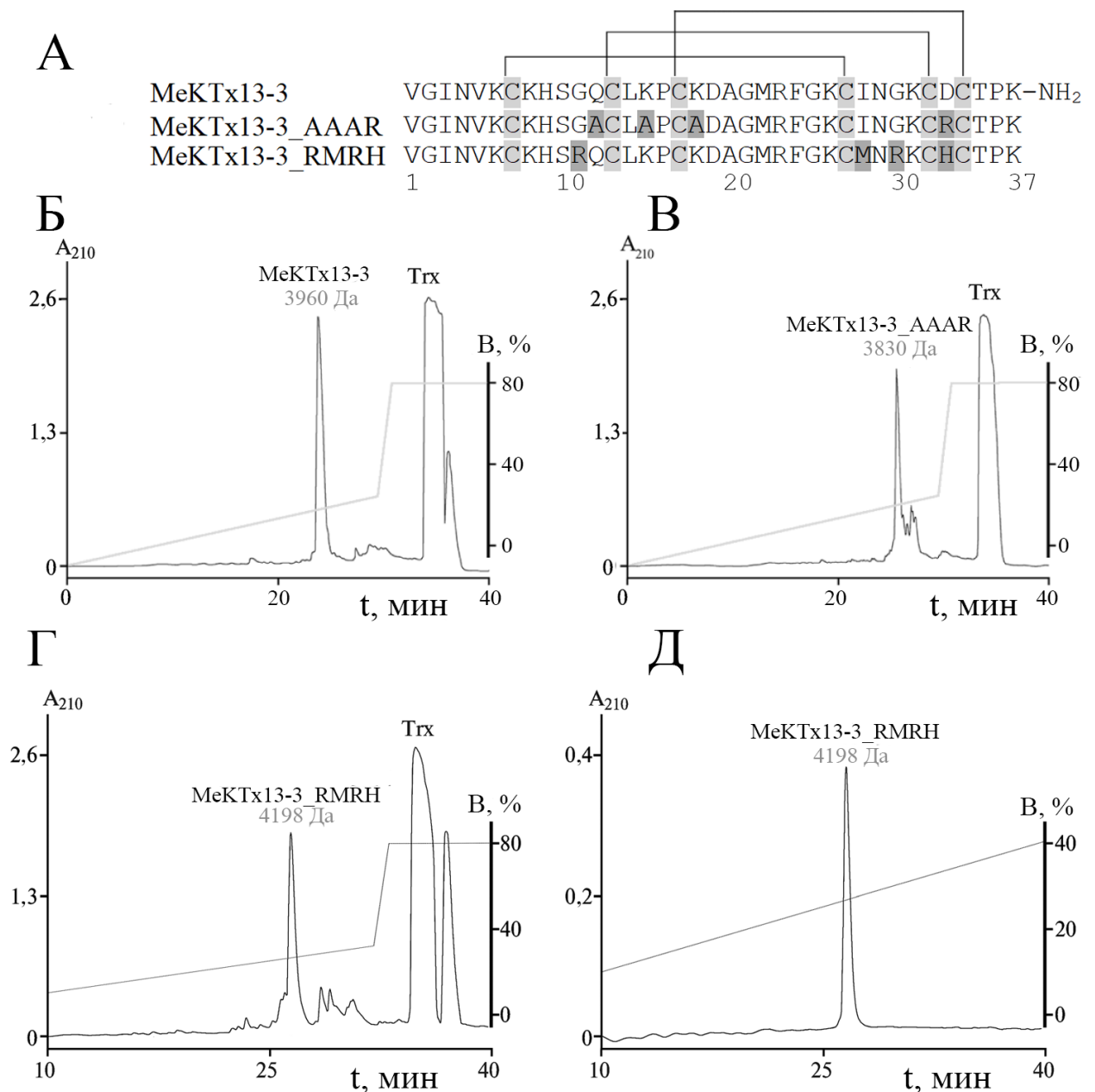


Рисунок 6. Получение MeKTx13-3 и его производных. (А) Сравнение аминокислотных последовательностей MeKTx13-3, MeKTx13-3\_RMRH и MeKTx13-3\_AAAR. Темно-серым цветом обозначены позиции, в которые были введены замены. Остатки цистеина на сером фоне, а линии над последовательностями указывают дисульфидные связи. Нумерация а.о. приведена под последовательностями. (Б–Г) Очистка рекомбинантных MeKTx13-3, MeKTx13-3\_AAAR и MeKTx13-3\_RMRH с помощью ОФ-ВЭЖХ в градиенте концентрации ацетонитрила (В = 80% CH<sub>3</sub>CN, 0,1% трифторуксусной кислоты) на колонке Jupiter C<sub>5</sub> (250×4,6 мм) после расщепления гибридного белка легкой цепью энтеропептидазы человека. Для целевых пептидов указаны измеренные моноизотопные молекулярные массы. (Д) Проверка чистоты выделенного MeKTx13-3\_RMRH с помощью ОФ-ВЭЖХ.

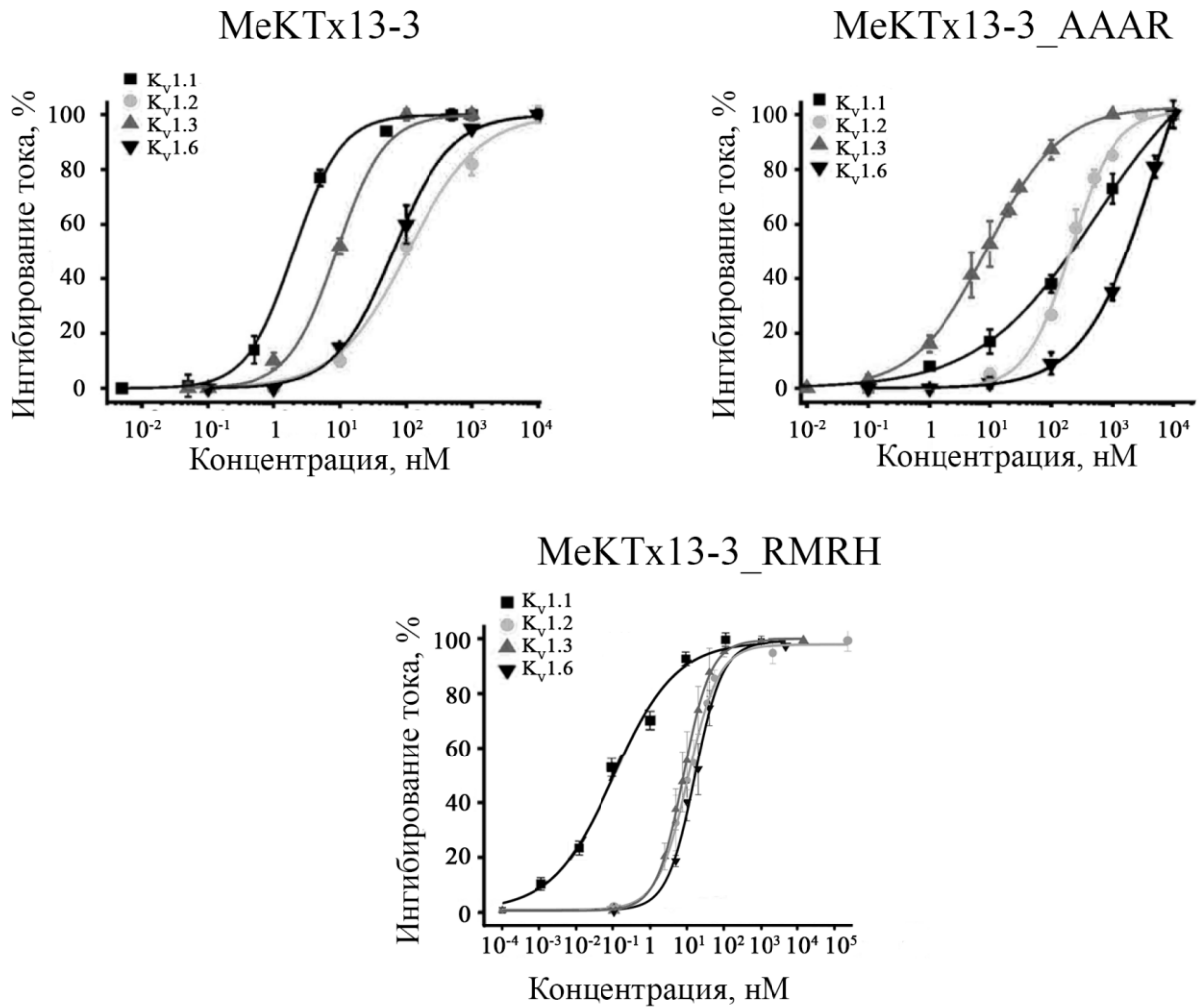


Рисунок 7. Кривые зависимости ингибирования тока от концентрации пептида для MeKTx13-3 и его производных в отношении каналов  $K_v1.1-1.3$  и 1.6.

Таблица 2. Значения  $IC_{50}$ , рассчитанные для MeKTx13-3 и его производных MeKTx13-3\_AAAR и MeKTx13-3\_RMRH по отношению к  $K_v1.1-1.3$  и 1.6.

Пептид	$IC_{50}$ , нМ			
	$K_v1.1$	$K_v1.2$	$K_v1.3$	$K_v1.6$
MeKTx13-3	$1,9 \pm 0,2$	$105,9 \pm 14,6$	$8,9 \pm 0,9$	$63,4 \pm 4,5$
MeKTx13-3_AAAR	$541,5 \pm 48,6$	$208,2 \pm 15,2$	$9,1 \pm 0,4$	$1522,3 \pm 183,4$
MeKTx13-3_RMRH	$0,11 \pm 0,02$	$10,7 \pm 0,8$	$8,1 \pm 0,2$	$16,3 \pm 1,0$

R11 и R30, имеющиеся у MeKTx13-3\_RMRH, вносят значительный благоприятный вклад в энергию взаимодействия с  $K_v1.1$ . Более того, эти модификации приводят к образованию двенадцати (четверть от общего числа) межмолекулярных контактов: трех

солевых мостиков (R11–D361, R11–D377, R30–D361), трех водородных связей, а также трех  $\pi$ - $\pi$  и трех  $\pi$ -катионных взаимодействий (R11–H355, R11–F356, R30–F356) в комплексе с Kv1.1. Стоит отметить, что аналогичные контакты невозможны в комплексах MeKTx13-3 с Kv, поскольку остатки G11 и G30 токсина не имеют боковых цепей. Обобщая результаты вычислительного анализа, можно сделать вывод, что R11 и R30 играют существенную роль в селективном связывании MeKTx13-3\_RMRH с Kv1.1. В комплексах с Kv-каналами эти а.о. стабилизируют специфическое положение токсина относительно канального белка за счет большого количества межмолекулярных взаимодействий. Особое расположение токсина обеспечивает формирование дополнительных контактов (остатками H9, Q12, K31, R36, K37) в комплексе с Kv1.1, что, как мы полагаем, лежит в основе высокого сродства к этой изоформе.

### *Производное ChTx*

При анализе литературы была обнаружена работа, в которой обсуждалось взаимодействие токсина ChTx с каналом *Drosophila melanogaster* Shaker. В канале дикого типа имеется остаток T449, и с ChTx образуется высокоаффинный комплекс ( $K_d \approx 0,063$  нМ). Однако, если в канал ввести замену T449F, а в токсин M29I, то образуется намного более слабый комплекс ( $K_d \approx 1100$  нМ). Из этого наблюдения можно сделать вывод, что взаимодействие изолейцина с большим ароматическим а.о. имеет положительный вклад в свободную энергию комплексообразования. Мы сравнили аминокислотные последовательности канала Shaker и его гомологов у млекопитающих (Рис. 8) и обнаружили, что в Kv-каналах человека в том же положении находятся различные а.о. Поскольку известно, как действует ChTx дикого типа на Kv1-каналы млекопитающих, мы решили проверить, изменится ли аффинность ChTx с заменой M29I и сохранится ли тенденция ухудшения взаимодействия пептида с каналом, у которого в положении, соответствующем T449 в канале Shaker, находится большой ароматический а.о.

Мы получили пептид ChTx\_M29I и исследовали его активность. По сравнению с обычным ChTx его аффинность к каналам Kv1.1 и 1.6 упала: в концентрации 2 мкМ блок тока составил  $3,1 \pm 2,7\%$  и  $9,6 \pm 0,6\%$  соответственно (Табл. 3). Токсин дикого типа является слабо селективным по отношению к каналу Kv1.3, а у его мутанта аффинность к этому каналу упала в  $\approx 20$  раз. И наоборот, к каналу Kv1.2 он стал в 1500 раз более аффинным ( $IK_{50} = 6,0 \pm 0,4$  пМ). Для ChTx\_M29I отношение  $IK_{50}$  к Kv1.2 и 1.3 составило 680. Таким образом, этот пептид является примером высокоселективного лиганда Kv1.2.



Shaker	417	AEAGSENSFFKSI	PDAFWWAVVTMTTVGYGDM	TPVGV	453
hK <sub>v</sub> 1.1	347	AEAEAEESHFSSI	PDAFWWAVVSM	TTVGYGDMYPVTI	383
hK <sub>v</sub> 1.2	349	AEADERESQFPSI	PDAFWWAVVSM	TTVGYGDMVPTTI	385
hK <sub>v</sub> 1.3	419	AEADDPTS	SGFSSIPDAFWWAVVTMTTVGYGDM	HPVTI	455
hK <sub>v</sub> 1.6	397	AEADDDDSL	LFSSIPDAFWWAVVTMTTVGYGDM	YPMTV	433

Рисунок 8. Сравнение аминокислотных последовательностей области вестибуля поры каналов Shaker и K<sub>v</sub>1. Серым фоном показаны различающиеся а.о., полужирным выделены ключевые а.о., предположительно взаимодействующие с остатком M/I29 у ChTx и ChTx\_M29I.

Таблица 3. Сравнение аминокислотных последовательностей и фармакологическая характеристика ChTx и ChTx\_M29I. Светло-серым выделены остатки цистеина, темно-серым обозначена позиция, в которую вносилась замена. Z обозначает остаток пироглутаминовой кислоты. Указаны значения K<sub>d</sub> (для ChTx) и ИК<sub>50</sub> (для ChTx\_M29I) в нМ.

Пептид	Последовательность	Активность, нМ			
		K <sub>v</sub> 1.1	K <sub>v</sub> 1.2	K <sub>v</sub> 1.3	K <sub>v</sub> 1.6
	1      10      20      30      36				
ChTx	ZFTNVSC <b>CTTSKE</b> CWSVCQRLHNTSRGK <b>CM</b> NKKRCYS	1500	9	0,19	22
ChTx_M29I	ZFTNVSC <b>CTTSKE</b> CWSVCQRLHNTSRGK <b>CT</b> NKKRCYS	2000/3,1 <sup>1</sup>	0,0060 ± 0,0004	4,1 ± 0,8	2000/9,6

<sup>1</sup>“А/Б” означает, что в концентрации А нМ пептид блокирует ток через канал на Б процентов. Нумерация а.о. приведена над последовательностями.

Таким образом, нами при помощи мутагенеза были получены селективные лиганды трех каналов: K<sub>v</sub>1.1–1.3. В случае MeKTx13-3\_AAAR замены были предложены на основе анализа моделей комплексов MeKTx13-3 с K<sub>v</sub>-каналами и были направлены на снижение аффинности к нецелевым изоформам. В случае MeKTx13-3\_RMRH и ChTx\_M29I мы опирались на опубликованные результаты мутагенеза, в результате чего у MeKTx13-3\_RMRH селективность сместилась еще больше в сторону K<sub>v</sub>1.1, а у ChTx\_M29I — в сторону K<sub>v</sub>1.2. Эти три изоформы являются перспективными мишенями для разработки лекарств, поскольку они связаны с неврологическими и аутоиммунными заболеваниями.

## Селективные лиганды на основе инертного каркаса

*Tk-hefu-10*

Ранее в нашей лаборатории проводились эксперименты по превращению неактивного на калиевых каналах  $\alpha$ -гарпинина Tk-AMP-X2 из пшеницы *Triticum kiharae*, состоящего из 28 а.о. и содержащего два S-S-мостика (C<sup>1</sup>–C<sup>4</sup>, C<sup>2</sup>–C<sup>3</sup>), в активный блокатор. В результате были получены искусственные пептиды Tk-hefu-1 и 2 (Табл. 4), которые проявляли слабую активность к каналу Kv1.3. В данной работе были предприняты попытки получить более аффинное производное при помощи методов компьютерного моделирования. На первом этапе на основе известной структуры Tk-hefu-1 (PDB ID: 5LM0) была создана модель Tk-hefu-2, которая затем использовалась для получения модели комплекса Tk-hefu-2—Kv1.3. Она была построена на основе комплекса ChTx с химерным каналом Kv1.2/2.1, как описано выше, но в этом случае ChTx заменялся на Tk-hefu-2 так, чтобы ключевые остатки Y6 и K22 у Tk-hefu-2 накладывались на Y36 и K27 у ChTx. При анализе модели мы предложили 11 аналогов Tk-hefu-2 с потенциально более высоким сродством к Kv1.3 (Tk-hefu-5, 6 и Tk-hefu-2\_v1–v9; Табл. 4). Стратегия заключалась в том, чтобы ввести замены в Tk-hefu-2 так, чтобы на предполагаемой контактной поверхности с каналом было больше положительно заряженных или меньше отрицательно заряженных а.о.

Были получены рекомбинантные Tk-hefu-5 и 6, активность которых оценивалась против Kv1.3. Значения ИК<sub>50</sub> составили  $2,7 \pm 0,3$  и  $0,7 \pm 0,1$  мкМ соответственно, тогда как ИК<sub>50</sub> для «родительского» пептида Tk-hefu-2 составляла  $2,3 \pm 0,4$  мкМ (Табл. 4). На основании этих результатов Tk-hefu-6 был выбран в качестве отправной точки для дальнейшего повышения аффинности к Kv1.3. Теперь стратегия была модифицирована так, чтобы: 1) увеличить количество положительно заряженных а.о. на определенных участках, взаимодействующих с каналом, и/или уменьшить количество отрицательно заряженных а.о.; 2) локально «разгрузить» удаленные от канала части пептида от избыточных положительных зарядов; 3) увеличить количество водородных связей без изменения заряда (а именно за счет замен К на R). Мы предложили 11 новых пептидов (Tk-hefu-6\_v1–v11) и смоделировали влияние соответствующих замен.

Многие из предложенных модификаций позволили сформировать дополнительные специфические межмолекулярные контакты по сравнению с комплексом Tk-hefu-6—Kv1.3. Замены К на R приводили к образованию дополнительных солевых мостиков (до двух) и водородных связей (до трех). Замена Y6K дала множественные солевые мостики,

водородные связи и  $\pi$ -катионные взаимодействия. D2N и D2Q также привели к увеличению количества водородных связей (до трех). При замене Q10K появлялись дополнительные солевой мостик и  $\pi$ -катионное взаимодействие, а при K18Y тирозин образовывал дополнительный стэкинг-контакт, тогда как R4Q, R7Q, R11Q, D14Q и E17Q существенно не влияли на общее количество межмолекулярных контактов.

Анализ замен в структуре Tk-hefu-6 выявил те, которые, вероятно, приведут к усилению связывания с каналом  $K_v1.3$ . Мы выбрали несколько таких замен и получили рекомбинантные пептиды, названные Tk-hefu-7–10 (Табл. 4). Эти пептиды мы тестировали в концентрации 0,7 мкМ на  $K_v1.3$  для сравнения с «родительским» Tk-hefu-6 (его  $ИК_{50} \approx 0,7$  мкМ). Tk-hefu-7–10 блокировали  $K_v1.3$ -опосредованные токи на  $\approx 39, 59, 62$  и  $69\%$  соответственно. Для проверки селективности Tk-hefu-10, наиболее аффинного производного, его активность измеряли на каналах  $K_v1.1, 1.2$  и  $1.6$ . При концентрации пептида 5 мкМ соответствующие токи блокировались на 54, 50 и  $30\%$  (Рис. 9, Табл. 4).  $ИК_{50}$  в отношении  $K_v1.3$  составила  $152,7 \pm 34,2$  нМ, что соответствует 4,6 и 15,1-кратному увеличению аффинности по сравнению с Tk-hefu-6 и 2. Tk-hefu-10 сохраняет высокую селективность Tk-hefu-2; значение  $ИК_{50}$  для  $K_v1.3$  в 33 раза ниже, чем для ближайшего по аффинности канала  $K_v1.2$ .

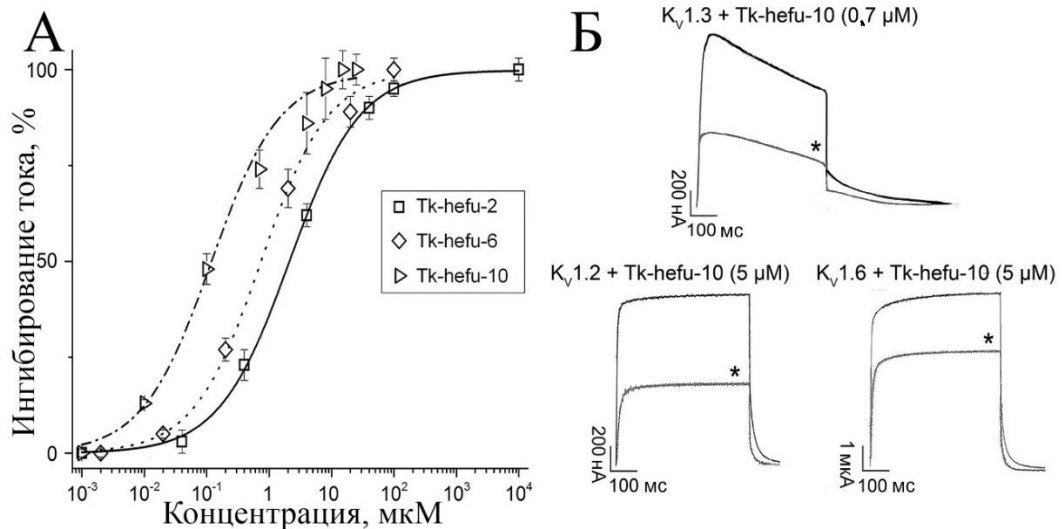


Рисунок 9. Активность производных Tk-hefu-2 на  $K_v$ -каналах. (А) Кривые зависимости ингибирования тока через каналы  $K_v1.3$  от концентрации пептидов для Tk-hefu-2, 6 и 10. (Б) Активность Tk-hefu-10 на каналах  $K_v1.2, 1.3$  и  $1.6$ , экспрессированных в ооцитах лягушки *X. laevis*. Показаны записи токов через соответствующие каналы в контроле и после добавления пептида (отмечены звездочкой) в указанных концентрациях.

Чтобы проверить, какие именно замены в Tk-hefu-10 привели к увеличению сродства, мы смоделировали его в комплексе с  $K_v1.3$  и подвергли МД (Рис. 10). Как и ожидалось, остаток Q2 образует дополнительную водородную связь с остатком H451. K3 формирует те же контакты, что в комплексе Tk-hefu-6— $K_v1.3$ , и дополнительно образует  $\pi$ -катионное взаимодействие с H451. Замена Y6K привела к дополнительному солевному мостику и  $\pi$ -катионному взаимодействию, но вызвала потерю одного стэкинг-контакта. Замены K18R и K19R привели к двум дополнительным стэкинг-взаимодействиям.

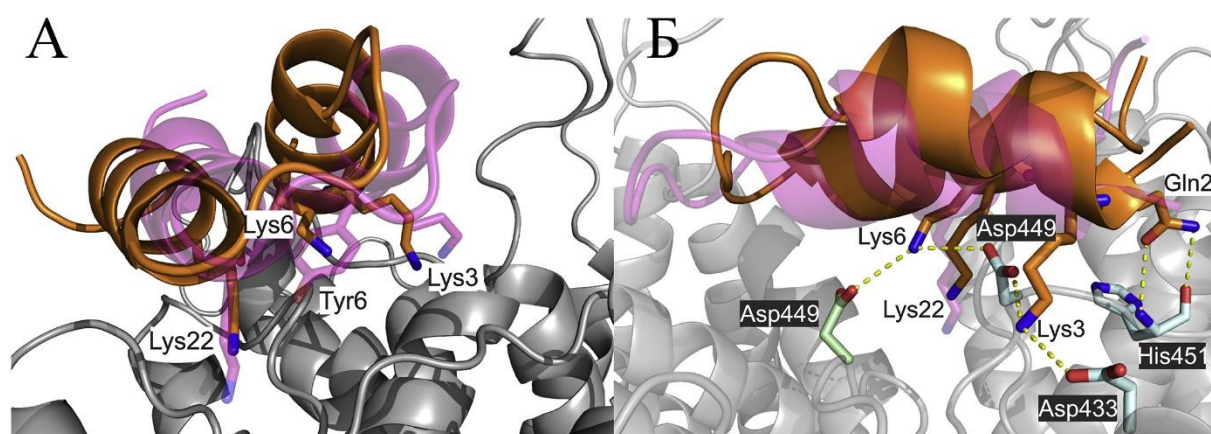


Рисунок 10. Модель комплекса Tk-hefu-10— $K_v1.3$ . (А) Сравнение положения Tk-hefu-10 (окрашен оранжевым) в устье поры канала после 100 нс МД с положением Tk-hefu-6 (показан полупрозрачным розовым).  $K_v1.3$  представлен в виде серой ленточной структуры. Остатки Y/K6, K22 и K3 показаны стержневой моделью. (Б) Вид сбоку на Tk-hefu-10. А.о. канала  $K_v1.3$  D433, D449 и H451 отображены голубой стержневой моделью, D449 соседней субъединицы показан бледно-зеленым. Остатки Q2, K3, K6 и K22 пептида Tk-hefu-10 также представлены стержневой моделью. Желтыми пунктирными линиями указаны межмолекулярные контакты.

### *Tk-hefu-11*

Среди полученных пептидов самым аффинным в отношении  $K_v$ -каналов оказался Tk-hefu-10. Замены в Tk-hefu-7–10 вводились поочередно, и можно отметить, что при переходе от Tk-hefu-6 к 7 произошло падение аффинности, а при переходе от Tk-hefu-8 к 9 увеличения аффинности почти не наблюдается (Табл. 4). В связи с этим мы решили сохранить лишь те а.о., которые приводили к значительному увеличению аффинности по отношению к каналу  $K_v1.3$ . Таким образом на основе предыдущих экспериментов был предложен новый пептид, названный Tk-hefu-11.

Этот пептид мы тестировали на тех же каналах, на которых был активен Tk-hefu-10. В концентрациях 2 мкМ и выше наблюдался лизис ооцитов, поэтому были рассчитаны значения полумаксимальной эффективной концентрации ( $ЭК_{50}$ ), которые для  $K_v1.3$  и  $1.6$  составили  $70,4 \pm 2,9$  нМ и  $10,0 \pm 0,5$  нМ соответственно, в то время как 1 мкМ Tk-hefu-11 ингибировал  $K_v1.1$  на  $41,2 \pm 2,9\%$  и  $K_v1.2$  на  $50,1 \pm 0,8\%$ . Эти данные указывают на более сильное ингибирование канала  $K_v1.6$  по сравнению с другими протестированными изоформами  $K_v$ -каналов, что делает Tk-hefu-11 уникальным пептидом, обладающим способностью ингибировать  $K_v1.6$  в наномолярном диапазоне концентраций и коэффициентом селективности  $>8$  (Табл. 4).

Пространственная структура Tk-hefu-11 в водном растворе была изучена методами спектроскопии ядерного магнитного резонанса В.А. Лушпой (лаборатория биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН; PDB ID: 7QXJ). Для этого мы получили  $^{15}N$ -меченый образец пептида. На основе изученной структуры мы построили гомологичную модель Tk-hefu-10. Чтобы выявить молекулярные детерминанты, которые служат причиной различий в активности Tk-hefu-10 и 11 на  $K_v$ -каналах, мы провели компьютерное исследование молекулярных комплексов этих пептидов с  $K_v1.3$  и  $1.6$ : рассчитали траектории МД, провели вычислительный анализ контактных поверхностей и энергетического вклада а.о. в комплексообразование. Анализ межмолекулярных контактов при МД показывает, что замены, введенные в Tk-hefu-11, совместно влияют на связывание с каналами. С одной стороны, при переходе от Tk-hefu-10 к 11 замена Q2D приводит к потере взаимодействия с  $K_v1.3$  за счет электростатического отталкивания от боковых цепей D433 и D449 (Рис. 11). Однако ни Q2, ни D2 в Tk-hefu-10 или 11 не образуют специфических контактов с  $K_v1.6$ .

С другой стороны, остаток K6 у Tk-hefu-10 участвует в солевом мостике, трех водородных связях и двух  $\pi$ -катионных контактах в комплексе с  $K_v1.3$ , тогда как остаток Y6 у Tk-hefu-11 образует только одну водородную связь и одно стэкинг-взаимодействие с каналом. В комплексе с  $K_v1.6$  тот же остаток K6 в структуре Tk-hefu-10 участвует в двух водородных связях и двух  $\pi$ -катионных контактах, а Y6 в Tk-hefu-11 образует только одну водородную связь. Замена Q7R еще сильнее влияет на распределение контактов в комплексах. Согласно нашему анализу, вместе с N-концом и R11, R7 обеспечивает высокую стабильность комплекса Tk-hefu-11 с  $K_v1.6$  и  $1.3$ .

Таблица 4. Аминокислотные последовательности и активность производных Tk-hefu против Kv-каналов. Жирным выделены вносимые замены в последовательность Tk-AMP-X2.

Название	Аминокислотная последовательность	Активность, нМ			
		Kv1.1	Kv1.2	Kv1.3	Kv1.6
	1 10 20 28				
Tk-AMP-X2	ADDRCERM <b>C</b> QRYHDRREKK <b>Q</b> CMK <b>G</b> CRYG	- <sup>1</sup>	-	-	-
Tk-hefu-1	ADDRC <b>Y</b> RM <b>C</b> QRYHDRREKK <b>Q</b> <b>CKE</b> GCRYG	-	40000/8,3 <sup>2</sup>	34000 ± 2800 <sup>3</sup>	40000/7,3
Tk-hefu-2	ADDRC <b>Y</b> RM <b>C</b> QRYHDRREKK <b>Q</b> <b>CKK</b> GCRYG	-	40000/11,7	2300 ± 400	40000/17,4
Tk-hefu-2_v1	AD <b>K</b> R <b>C</b> <b>Y</b> RM <b>C</b> QRYH <b>K</b> RREKK <b>Q</b> <b>CKK</b> GCRYG	4			
Tk-hefu-2_v2	A <b>K</b> DRC <b>Y</b> RM <b>C</b> QRYH <b>K</b> RREKK <b>Q</b> <b>CKK</b> GCRYG				
Tk-hefu-2_v3	A <b>KK</b> R <b>C</b> <b>Y</b> RM <b>C</b> QRYH <b>K</b> RREKK <b>Q</b> <b>CKK</b> GCRYG				
Tk-hefu-2_v4	A <b>KK</b> R <b>C</b> <b>Y</b> RM <b>C</b> QRYHDRREKK <b>Q</b> <b>CKK</b> GCRYG				
Tk-hefu-2_v5	ADDRC <b>Y</b> RM <b>C</b> QRYH <b>K</b> RREKK <b>Q</b> <b>CKK</b> GCRYG				
Tk-hefu-2_v6	ADDRC <b>Y</b> RM <b>C</b> QRYH <b>R</b> RREKK <b>Q</b> <b>CKK</b> GCRYG				
Tk-hefu-2_v7	ADDRC <b>Y</b> RM <b>C</b> QRYH <b>H</b> RREKK <b>Q</b> <b>CKK</b> GCRYG				
Tk-hefu-2_v8	ADDRC <b>Y</b> RM <b>C</b> QRYH <b>Q</b> RREKK <b>Q</b> <b>CKK</b> GCRYG				
Tk-hefu-2_v9	ADDRC <b>Y</b> RM <b>C</b> QRYH <b>W</b> RREKK <b>Q</b> <b>CKK</b> GCRYG				
Tk-hefu-5	A <b>K</b> DRC <b>Y</b> RM <b>C</b> QRYHDRREKK <b>Q</b> <b>CKK</b> GCRYG	-	10000/12 ± 3	2700 ± 300	-
Tk-hefu-6	AD <b>K</b> R <b>C</b> <b>Y</b> RM <b>C</b> QRYHDRREKK <b>Q</b> <b>CKK</b> GCRYG	5000/75 ± 5	5000/69 ± 1	700 ± 100	5000/58 ± 3
Tk-hefu-6_v1	AD <b>K</b> R <b>C</b> <b>Y</b> RM <b>C</b> QRYHDRR <b>Q</b> KK <b>Q</b> <b>CKK</b> GCRYG				
Tk-hefu-6_v2	AD <b>R</b> R <b>C</b> <b>Y</b> RM <b>C</b> QRYHDRREKK <b>Q</b> <b>CKR</b> GCRYG				
Tk-hefu-6_v3	AD <b>K</b> R <b>C</b> <b>Y</b> RM <b>C</b> <b>K</b> RYHDRRE <b>Y</b> K <b>Q</b> <b>CKK</b> GCRYG				
Tk-hefu-6_v4	AD <b>K</b> R <b>C</b> <b>Q</b> MCQRYHDRREKK <b>Q</b> <b>CKK</b> GCRYG				
Tk-hefu-6_v5	A <b>Q</b> K <b>R</b> <b>C</b> <b>Y</b> RM <b>C</b> QRYH <b>Q</b> RR <b>Q</b> KK <b>Q</b> <b>CKK</b> GCRYG				
Tk-hefu-6_v6	A <b>Q</b> K <b>Q</b> <b>C</b> <b>Y</b> Q <b>Q</b> MC <b>Q</b> <b>Q</b> YH <b>Q</b> RR <b>Q</b> KK <b>Q</b> <b>CKK</b> GCRYG				
Tk-hefu-6_v7	<b>S</b> N <b>R</b> <b>Q</b> <b>C</b> <b>Y</b> RM <b>C</b> QRYHDRREKK <b>Q</b> <b>CKK</b> GCRYG				
Tk-hefu-6_v8	<b>S</b> N <b>R</b> <b>Q</b> <b>CK</b> Q <b>Q</b> MC <b>Q</b> <b>Q</b> YH <b>Q</b> RR <b>Q</b> KK <b>Q</b> <b>CKK</b> GCRYG				
Tk-hefu-6_v9	A <b>Q</b> K <b>Q</b> <b>CK</b> Q <b>Q</b> MC <b>Q</b> <b>Q</b> YH <b>Q</b> RR <b>Q</b> KK <b>Q</b> <b>CKK</b> GCRYG				
Tk-hefu-6_v10	AD <b>K</b> R <b>C</b> <b>Y</b> RM <b>C</b> QRYHDRRE <b>RR</b> <b>Q</b> <b>CKK</b> GCRYG				
Tk-hefu-6_v11	<b>S</b> N <b>K</b> <b>Q</b> <b>C</b> <b>Y</b> RM <b>C</b> QRYHDRREKK <b>Q</b> <b>CKK</b> GCRYG				
Tk-hefu-7	A <b>Q</b> K <b>R</b> <b>C</b> <b>Y</b> RM <b>C</b> QRYHDRREKK <b>Q</b> <b>CKK</b> GCRYG	5000/62 ± 4	5000/48 ± 2	700/39	5000/68 ± 2
Tk-hefu-8	A <b>Q</b> K <b>R</b> <b>C</b> <b>Y</b> RM <b>C</b> QRYHDRRE <b>RR</b> <b>Q</b> <b>CKK</b> GCRYG	5000/72 ± 1	5000/40	700/59	5000/50 ± 2
Tk-hefu-9	A <b>Q</b> K <b>R</b> <b>C</b> <b>Q</b> MCQRYHDRRE <b>RR</b> <b>Q</b> <b>CKK</b> GCRYG	5000/79 ± 2	5000/24	700/62	5000/51 ± 1
Tk-hefu-10	A <b>Q</b> K <b>R</b> <b>C</b> <b>Q</b> MCQRYH <b>Q</b> RR <b>Q</b> RR <b>Q</b> <b>CKK</b> GCRYG	5000/54 ± 5	5000 ± 2000	152,7 ± 34,2	5000/30
Tk-hefu-11	AD <b>K</b> R <b>C</b> <b>Y</b> RM <b>C</b> QRYH <b>Q</b> RR <b>Q</b> RR <b>Q</b> <b>CKK</b> GCRYG	1000/41,2 ± 2,9	1000/50,1 ± 0,8	70,4 ± 2,9 <sup>5</sup>	10,0 ± 0,5 <sup>5</sup>

<sup>1</sup> Нет активности при 20 мкМ; <sup>2</sup> “А/В” означает, что в концентрации А нМ наблюдался блок на В процентов; <sup>3</sup> А ± Б — значения ИК<sub>50</sub> в нМ; <sup>4</sup> Пустые ячейки указывают на отсутствие данных; <sup>5</sup> Значения ЭК<sub>50</sub> в нМ. Нумерация а.о. приведена над последовательностями.

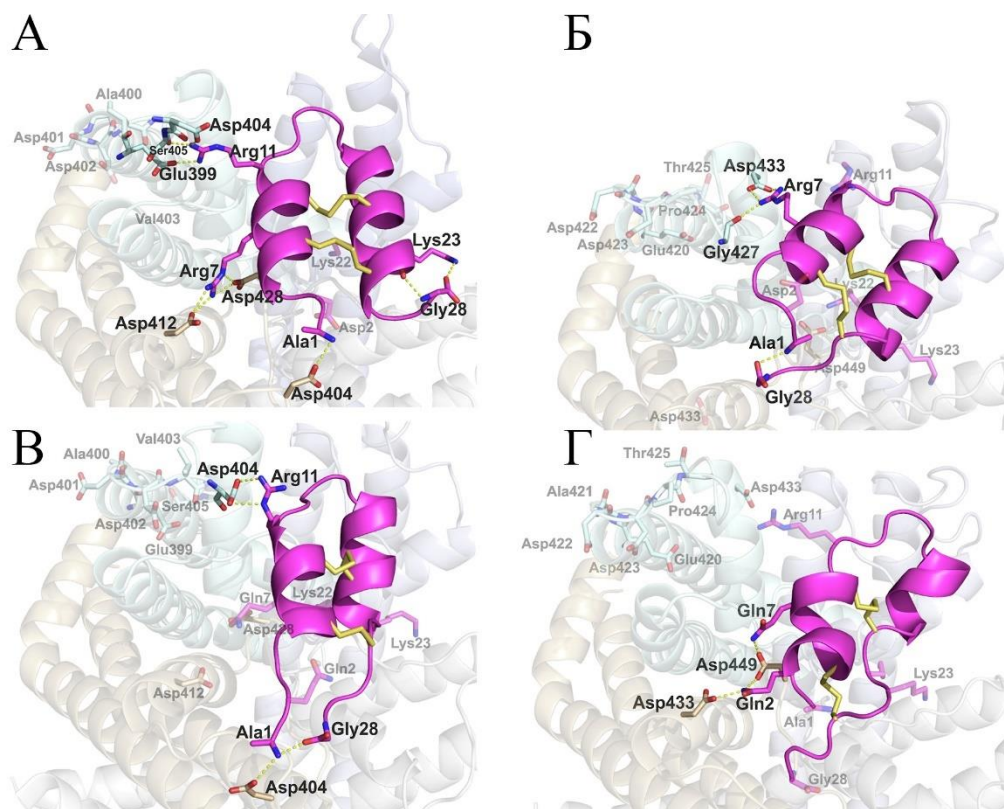


Рисунок 11. Комплексы Tk-hefu-10 и 11 с каналами  $K_v1.3$  и 1.6. (А) Tk-hefu-11 в комплексе с  $K_v1.6$ . (Б) Tk-hefu-11 с  $K_v1.3$ . (В) Tk-hefu-10 с  $K_v1.6$ . (Г) Tk-hefu-10 с  $K_v1.3$ . Желтыми пунктирными линиями указаны образуемые контакты.

Нам удалось получить селективные лиганды каналов  $K_v1.3$  и 1.6 на основе неактивного пептида при помощи компьютерного моделирования и мутагенеза. Мы предполагаем, что наш подход белковой инженерии можно использовать в случае других ионных каналов. Примечательно, что для  $K_v1.6$  известно немного специфичных лигандов со сравнительно низкой аффинностью; созданный нами Tk-hefu-11 обладает и высокой аффинностью, и селективностью в отношении этой изоформы. Мы надеемся, что Tk-hefu-11 будет использован как молекулярный инструмент для изучения функций  $K_v1.6$ .

## Заключение

С использованием методов молекулярного моделирования в структуре пептидных поровых блокаторов  $K_v$ -каналов были предсказаны аминокислотные замены для увеличения селективности в отношении выбранных изоформ:  $K_v1.1-1.3$  и  $1.6$ . На основе пептидов, как проявляющих активность в отношении  $K_v$ -каналов, так и являющихся неактивными, были получены высокоаффинные и селективные лиганды указанных каналов. Детальный анализ молекулярных моделей и результатов электрофизиологических измерений позволил определить детерминанты селективности изученных поровых блокаторов  $K_v$ -каналов.

Эффект двух различающихся а.о. MeKTx11-1 и 3, проявляющих разный уровень селективности в отношении  $K_v1.2$ , опосредованный: они влияют на взаимодействие с каналом соседних а.о. В структуру MeKTx13-3\_AAAR были введены такие аминокислотные замены, что пептид стал образовывать меньше контактов с нецелевыми каналами. Это привело к падению его аффинности к каналам  $K_v1.1$  и  $1.2$ , в то время как аффинность к целевой изоформе  $K_v1.3$  не изменилась. Замены в MeKTx13-3\_RMRH были предложены на основании анализа литературы. Вопреки нашим ожиданиям, полученный пептид оказался  $K_v1.1$ -селективным. Молекулярное моделирование позволило объяснить этот эффект — он связан с изменением расположения пептида в поре канала по сравнению с исходным MeKTx13-3. Повышение селективности ChTx\_M29I к каналу  $K_v1.2$ , по всей видимости, объясняется взаимодействием замененного а.о. с переменным а.о. во внешнем вестибуле поры  $K_v1$ -каналов.

При помощи нескольких раундов молекулярного моделирования нам удалось получить селективный по отношению к изоформе  $K_v1.3$  пептид Tk-hefu-10, созданный на основе неактивного соединения. А дальнейшее внесение замен позволило получить уникальный пептид, селективный к каналу  $K_v1.6$ . Столь резкое изменение селективности объясняется тем, что внесенные замены изменяют конформацию молекулы, и в итоге она принимает иное положение в вестибуле поры канала и образует множество новых выгодных контактов.



## Выводы

1. Построены молекулярные модели комплексов потенциал-чувствительных калиевых каналов Kv1.1–1.3 и 1.6 с их природными и искусственными пептидными поровыми блокаторами. Анализ моделей позволил предложить модификации в структуру блокаторов для увеличения их селективности.
2. В бактериальной системе экспрессии получено 15 рекомбинантных пептидов с предложенными модификациями с выходом 2–10 мг с литра питательной среды, что позволило изучить влияние внесенных аминокислотных замен на активность.
3. Охарактеризовано действие полученных пептидов на потенциал-чувствительные калиевые каналы, экспрессированные в ооцитах лягушки *Xenopus laevis*, методом двухэлектродной фиксации потенциала.
4. С использованием двух различных подходов: мутагенеза известных токсинов и белковой инженерии неактивного пептида — получены селективные поровые блокаторы четырех изоформ каналов. MeKTx13-3\_RMRH избирательно блокирует Kv1.1, ChTx\_M29I — Kv1.2, MeKTx13-3\_AAAR и Tk-hefu-10 — Kv1.3, Tk-hefu-11 — Kv1.6.
5. Анализ детерминант селективности полученных лигандов калиевых каналов показал, что в большинстве случаев увеличенная аффинность к определенной изоформе есть результат образования множественных межмолекулярных контактов. В случае Tk-hefu-11 новые контакты образовались за счет изменения его конформации из-за внесенных замен.

## Список публикаций по теме диссертации

1. Kuzmenkov A.I., Nekrasova O.V., Peigneur S., Tabakmakher V.M., **Gigolaev A.M.**, Fradkov A.F., Kudryashova K.S., Chugunov A.O., Efremov R.G., Tytgat J., Feofanov A.V., Vassilevski A.A., 2018. Kv1.2 channel-specific blocker from *Mesobuthus eupeus* scorpion venom: Structural basis of selectivity // *Neuropharmacology*. V. 143. P. 228–238.
2. **Gigolaev A.M.**, Kuzmenkov A.I., Peigneur S., Tabakmakher V.M., Pinheiro-Junior E.L., Chugunov A.O., Efremov R.G., Tytgat J., Vassilevski A.A., 2020. Tuning scorpion toxin selectivity: Switching from Kv1.1 to Kv1.3 // *Front. Pharmacol.* V. 11: 1010.
3. Tabakmakher V.M., **Gigolaev A.M.**, Peigneur S., Krylov N.A., Tytgat J., Chugunov A.O., Vassilevski A.A., Efremov R.G., 2021. Potassium channel blocker crafted by  $\alpha$ -hairpinin scaffold engineering // *Biophys. J.* V. 120. P. 2471–2481.
4. Табакмахер В.М., Кузьменков А.И., **Гиголаев А.М.**, Пиньейро-Жуниор Э.Л., Пеньёр С., Ефремов Р.Г., Титгат Я., Василевский А.А., 2021. Искусственный пептидный лиганд калиевого канала Kv1.1 с высокой селективностью // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. V. 107. P. 584–604.
5. **Gigolaev A.M.**, Lushpa V.A., Pinheiro-Junior E.L., Tabakmakher V.M., Peigneur S., Ignatova A.A., Feofanov A. V., Efremov R.G., Mineev K.S., Tytgat J., Vassilevski A.A., 2022. Artificial pore blocker acts specifically on voltage-gated potassium channel isoform Kv1.6 // *J. Biol. Chem.* V. 298: 102467.
6. **Гиголаев А.М.**, Пиньейро-Жуниор Э.Л., Пеньёр С., Титгат Я., Василевский А.А., 2022. Высокоаффинный Kv1.2-селективный пептид // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. V. 108. P. 1627–1638.

## Тезисы конференций

- Искусственный пептид, селективно блокирующий калиевые каналы Kv1.3 // **А.М. Гиголаев**, С. Пеньёр, В.М. Табакмахер, А.О. Чугунов, Я. Титгат, Р.Г. Ефремов, А.А. Василевский // XXXI Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 2019.
- Создание селективного блокатора калиевого канала Kv1.3 // **А.М. Гиголаев**, А.О. Чугунов, В.М. Табакмахер, А.А. Василевский // Конференция «Ломоносов 2021», Секция «Биохимия», Москва, 2021.
- Направленный мутагенез токсина скорпиона, блокирующего калиевые каналы // **А.М. Гиголаев**, В.М. Табакмахер, А.И. Кузьменков, Э.Л. Пиньейро-Жуниор, С. Пеньёр, А.О. Чугунов, Р.Г. Ефремов, Я. Титгат, А.А. Василевский // X российский симпозиум «Белки и пептиды», Сочи – Дагомыс, 2021.
- Новый высокоаффинный пептидный лиганд калиевого канала Kv1.6 // **А.М. Гиголаев**, В.М. Табакмахер, Э.Л. Пиньейро-Жуниор, В.А. Лушпа, С. Пеньёр, К.С. Минеев, Р.Г. Ефремов, Я. Титгат, А.А. Василевский // XXXIV Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 2022.