

**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

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель:  
кандидат химических наук  
А.А. Василевский

Москва, 2023 г.

## Оглавление

Список сокращений .....	4
Введение .....	5
Цель и задачи исследования .....	6
1. Обзор литературы .....	7
1.1 Введение .....	7
1.2 Калиевые каналы .....	7
1.2.1 K <sub>v</sub> -каналы .....	9
1.3 Токсины из яда скорпионов, действующие на K <sup>+</sup> -каналы .....	23
1.3.1 Пептидные токсины из яда скорпионов .....	23
1.4 Резюме .....	32
2. Материалы и методы .....	33
2.1 Материалы .....	33
2.1.1 Оборудование и расходные материалы .....	33
2.1.2 Реактивы .....	34
2.1.3 Растворы .....	35
2.1.4 Бактериальные штаммы .....	36
2.1.5 Клетки для экспрессии K <sup>+</sup> -каналов .....	37
2.1.6 Наборы реактивов .....	37
2.1.7 Программное обеспечение .....	37
2.2 Методы .....	38
2.2.1 Получение плазмидных векторов для экспрессии трансгенов .....	38
2.2.2 Получение рекомбинантных пептидов .....	41
2.2.3 Изучение рекомбинантных пептидов .....	43
2.2.4 Молекулярное моделирование .....	47
3. Результаты .....	51
3.1 Изучение токсинов из яда скорпиона <i>Mesobuthus eupeus</i> .....	51
3.1.1 Получение и характеристика токсинов MeKTx11-1 и 3 .....	51
3.2 Получение селективных лигандов на основе известных токсинов .....	61
3.2.1 MeKTx13-3_AAAR и MeKTX13-3_RMRH .....	61
3.2.2 Получение рекомбинантного пептида ChTx_M29I .....	73
3.3 Искусственные пептиды, полученные на основе α-гарпининов .....	78
3.3.1 Получение и изучение пептида Tk-hefu-10 .....	78
3.3.2 Получение и изучение пептида Tk-hefu-11 .....	87
Выводы .....	99
Благодарности .....	100

Список литературы .....	101
Приложение 1 .....	93

## Список сокращений

4-АП — 4-аминопиридин

ТЭА — тетраэтиламмоний

КТх — токсины, действующие на калиевые каналы

МАЛДИ МС — метод матрично-активированной лазерной десорбции-ионизации масс-спектрометрии

K<sup>+</sup>-каналы — калиевые каналы

K<sub>v</sub>-каналы — потенциал-чувствительные калиевые каналы

Na<sup>+</sup>-каналы — натриевые каналы

Ca<sup>2+</sup>-каналы — кальциевые каналы

МД — молекулярная динамика

ИК<sub>50</sub> — полумаксимальная ингибирующая концентрация

ЭК<sub>50</sub> — полумаксимальная эффективная концентрация

ChTx — харибдотоксин

АМП — антимикробные пептиды

## Введение

Потенциал-чувствительные калиевые каналы ( $K_V$ -каналы) — важная группа калиевых каналов ( $K^+$ -каналов), участвующая в различных процессах, таких как передача нервного возбуждения и формирование иммунного ответа.  $K_V$ -каналы активируются при деполаризации клеточной мембраны и непосредственно участвуют в ее реполяризации. Помимо этого, они задействованы в развитии ряда патологий, например некоторых заболеваний сердечно-сосудистой системы, аутоиммунных и онкологических заболеваний. Среди всего многообразия  $K_V$ -каналов выделяют подсемейство  $K_V1$ . Это так называемые Shaker-подобные каналы, гомологи канала Shaker из *Drosophila melanogaster*. Они представляют интерес, поскольку для некоторых из них изучена пространственная структура, в том числе в комплексе с лигандами, а также ввиду их связи с аутоиммунными и неврологическими заболеваниями. Таким образом,  $K_V1$ -каналы являются перспективными фармакологическими мишенями, и в настоящее время ведется активный поиск и разработка лекарств на основе взаимодействующих с ними веществ.

Важнейшей группой лигандов  $K^+$ -каналов являются токсины скорпионов (КТх). Они представляют интерес, поскольку с их помощью можно изучать работу каналов в норме и патологии, а также определять субъединичный состав каналов. Важным представляется изучение молекулярных детерминант, лежащих в основе селективности пептидных лигандов, поскольку они придают способность узнавать отдельные изоформы среди всего разнообразия  $K^+$ -каналов. В свою очередь, селективные лиганды могут стать перспективными фармакологическими агентами.

В соответствии с вышесказанным, наша работа посвящена разработке подхода к поиску детерминант селективности и созданию селективных лигандов  $K_V1$ -каналов. На основании данных компьютерного моделирования будут синтезированы различные варианты пептидных лигандов в бактериальной системе экспрессии. Проверка их активности будет проводиться при помощи метода двухэлектродной фиксации потенциала на  $K_V1$ -каналах, экспрессированных в ооцитах лягушки *Xenopus laevis*.

## Цель и задачи исследования

Цель: сконструировать и получить селективные лиганды потенциал-чувствительных калиевых каналов Kv1 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.

## 1. Обзор литературы

### 1.1 Введение

Обзор литературы посвящен вопросу активности пептидных поровых блокаторов  $K^+$ -каналов из яда скорпионов. Первая глава рассматривает  $K_V$ -каналы во всем их разнообразии среди других ионных каналов. Здесь подробно описываются их структура и механизм работы, а их роль в норме и патологии иллюстрируются на примере каналов подсемейства  $K_{V1}$ . Вторая глава посвящена токсинам из яда скорпионов как лигандам различных каналов, в частности наиболее разнообразным КТх. Здесь описано их положение среди других составляющих яда скорпионов, классификация, детерминанты, обуславливающие их активность, а также сравнение с другими известными лигандами каналов.

### 1.2 Калиевые каналы

Ионные каналы — это трансмембранные белки, обуславливающие пассивный мембранный транспорт ионов в клеточных мембранах. Они являются древней группой белков и выполняют широкий диапазон функций. Различные типы ионных каналов могут работать согласованно для выполнения таких функций как передача сигнала в нервной системе, изменение клеточного объема, регуляция апоптоза и иммунного ответа, поддержание гомеостаза, сокращение мышц и других. Ионные каналы можно разделить на группы по стимулу, который вызывает их активацию, и тогда выделяют: механочувствительные, термочувствительные, потенциал-чувствительные, светочувствительные и хемочувствительные (лиганд-управляемые). С другой стороны, их можно разделить по типу пропускаемых ионов: катионные и анионные. Катионные каналы, в свою очередь, разделяются на натриевые ( $Na^+$ -каналы), калиевые ( $K^+$ -каналы), кальциевые ( $Ca^{2+}$ -каналы) и неселективные [1]. Среди них самой большой и распространенной группой являются  $K^+$ -каналы [2] (Рис. 1).

$K^+$ -каналы можно обнаружить практически у всех живых организмов, включая бактерий и архей. Так, например, в геноме человека имеется 78 генов  $\alpha$ -субъединиц  $K^+$ -каналов. У бактерий и архей обнаружено множество генов, кодирующих похожие на эукариотические  $K^+$ -каналы. Наличие таких похожих молекул во всех доменах жизни на Земле позволяет предположить, что они появились примерно в одно время с возникновением жизни вообще [3].

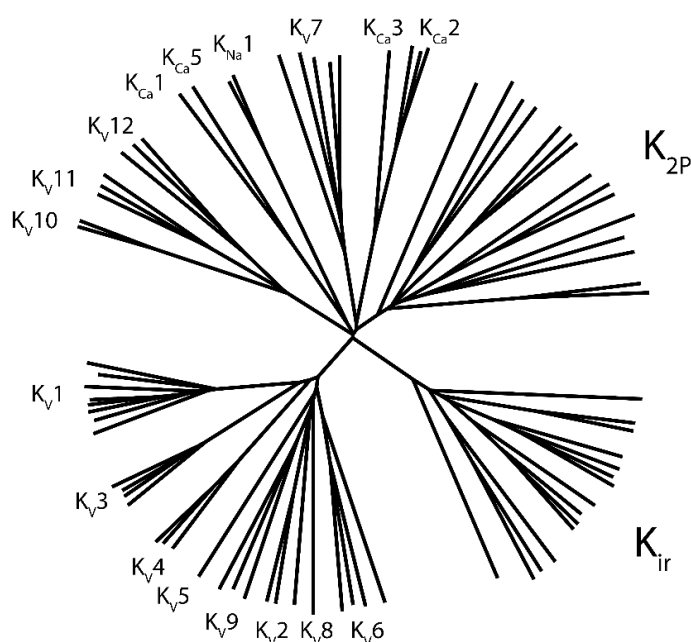


Рисунок 1. Филогенетическое дерево  $K^+$ -каналов человека. Дерево было построено на основании сравнения аминокислотных последовательностей каналов человека с использованием инструментария Clustal $\Omega$  (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Визуализация выполнена в программе FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>).

Структурно  $K^+$ -каналы состоят из двух типов субъединиц:  $\alpha$  и  $\beta$ , причем  $\alpha$ -субъединицы обязательные, именно они образуют ион-проводящую пору, а  $\beta$ -субъединицы являются дополнительными или регуляторными. В большинстве случаев для формирования функционального канала необходимо четыре  $\alpha$ -субъединицы, причем образовавшийся канал может состоять как из одинаковых субъединиц (гомотетрамер), так и из разных (гетеротетрамер). Характерные для клеток человека  $K^+$ -каналы делят на пять групп на основе различий их  $\alpha$ -субъединиц (Рис. 2):

1)  $\alpha$ -Субъединицы  $K^+$ -каналов входящего выпрямления ( $K_{ir}$ ) состоят из двух транс-мембранных (ТМ) сегментов с поровым (P) участком (P-петлей) между ними. Работа этих каналов модулируется химическими соединениями (нуклеотидами (АТФ, АДФ), фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфатом), а также фосфорилированием и G-белками. У человека  $K_{ir}$  каналы кодируются 15 различными генами [4, 5].

2)  $\alpha$ -Субъединицы двупоровых каналов ( $K_{2P}$ ) имеют два P-участка и построены из четырех ТМ сегментов. Эти  $K^+$ -каналы регулируются различными факторами: рН,



натяжением клеточной мембраны, температурой. У человека обнаружено 15 генов  $K_{2P}$  каналов [6, 7].

3)  $\alpha$ -Субъединицы потенциал-чувствительных  $K^+$ -каналов ( $K_V$ ) содержат шесть ТМ сегментов ( $S_1$ – $S_6$ ) с одним Р-участком между  $S_5$  и  $S_6$ . Важную роль в  $K_V$ -каналах играет потенциал-чувствительный домен (ПЧД), состоящий из четырех ТМ сегментов ( $S_1$ – $S_4$ ). Как считается, функцию непосредственного реагирования на изменения мембранного потенциала выполняет сенсор потенциала — спираль  $S_4$ , которая содержит положительно заряженные аминокислотные остатки (а.о.), расположенные регулярно, что не характерно для ТМ спиралей. В настоящее время считается, что наличие положительно заряженных а.о. в  $S_4$  компенсируется отрицательно заряженными а.о. в остальных сегментах ( $S_1$ – $S_3$ ). Это самая обширная группа  $K^+$ -каналов: у человека обнаружено 40 генов [8].

4)  $Ca^{2+}$ -Активируемые  $K^+$ -каналы малой ( $SK_{Ca}$ ) и средней ( $IK_{Ca}$ ) проводимости похожи по строению на  $K_V$ -каналы, они так же построены из  $\alpha$ -субъединиц, имеющих шесть ТМ сегментов с Р-участком между  $S_5$  и  $S_6$ . Но в случае этих каналов сегмент  $S_4$  нечувствителен к изменению потенциала. Активация  $Ca^{2+}$  является кальмодулин-опосредованной. Семейство этих каналов кодируется четырьмя генами у человека [9, 10].

5)  $Ca^{2+}$  и  $Na^+$ -активируемые  $K^+$ -каналы большой проводимости ( $BK_{Ca}$ ) состоят из  $\alpha$ -субъединиц, которые кодируются четырьмя *SLO* генами. Два представителя отличаются тем, что содержат семь ТМ спиралей ( $K_{Ca1.1}$  и  $K_{Ca5.1}$ ). Ранее их всех относили к  $Ca^{2+}$ -активируемым калиевым каналам, однако на данный момент дополнительно выделяют  $Na^+$ -активируемые калиевые каналы  $K_{Na1.1}$  и 1.2, которые также чувствительны к изменению рН и концентрации внутриклеточного  $Cl^-$  [11].

### 1.2.1 $K_V$ -каналы

#### *Доменная организация $K_V$ -каналов*

В структуре  $K_V$ -каналов можно выделить несколько частей: один поровый домен (ПД), образованный ТМ спиралью  $S_5$  и  $S_6$  с Р-участком между ними от каждой  $\alpha$ -субъединицы, четыре ПЧД, образованные четырьмя ТМ сегментами ( $S_1$ – $S_4$ ) в каждой субъединице и четыре цитоплазматических (Т1) домена. Зрелый  $K_V$ -канал образован четырьмя  $\alpha$ -субъединицами, его пора образована ПД, и он содержит четыре ПЧД, а также может содержать четыре  $\beta$ -субъединицы [12].

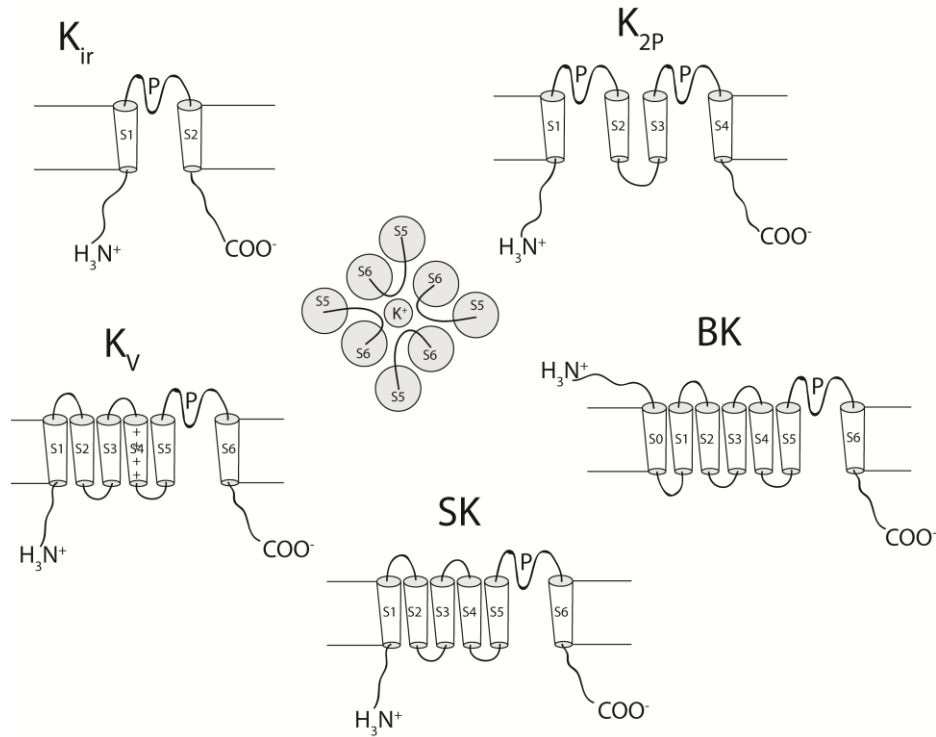


Рисунок 2. Схематическое изображение различий в строении  $\alpha$ -субъединиц  $K^+$ -каналов. В центре изображена пора, построенная из четырех поровых участков.  $S_1$ – $S_6$  — трансмембранные сегменты, P — поровый сегмент,  $S_4$  — потенциал-чувствительный сегмент у  $K_V$  и  $BK_{Ca}$ .

ПД  $K_V$ -каналов похож на ПД  $Na^+$  и  $Ca^{2+}$ -каналов, он позволяет пропускать примерно  $10^6$ – $10^8$  ионов  $K^+$  в секунду [13].  $K_V$ -каналы являются самым разнообразным семейством ионных каналов, но у всех представителей этого семейства встречается высококонсервативный участок из семи а.о. (консенсусная последовательность: TTVGYGD) [14], который образует селективный фильтр ПД. Его наличие в  $K_V$ -каналах позволяет пропускать ионы  $K^+$  с высочайшей избирательностью. Ионы  $Na^+$  с радиусом на  $0,4 \text{ \AA}$  меньше при этом практически не проходят. Высокая селективность обеспечивается карбонильными атомами кислорода основной цепи в поре, которые координируют ионы  $K^+$ , в точности повторяя их гидратную оболочку [15]. При этом радиус гидратированного иона  $Na^+$  не позволяет ему проходить через пору, а энергии образующихся координационных связей недостаточно для его дегидратации. При движении внутрь клетки ионы  $K^+$  сначала попадают во внешний вестибюль, затем лишаются гидратной оболочки, проходят через селективный фильтр, попав во внутреннюю полость канала обратно гидратируются и выходят через внутренние ворота. Также для ионов возможно движение и в обратном направлении [16].

ПЧД позволяет  $K_V$ -каналам реагировать на изменение мембранного потенциала клетки. Показано, что происходит изменение положения спирали  $S_4$  благодаря положительно заряженным а.о. в ее составе. Эти перестройки вызваны изменением мембранного потенциала, что провоцирует движение спирали  $S_4$ , своеобразный переход энергии электрического поля в механическую энергию, которая передается на ПД и вызывает изменения его конформации и открытие поры [17]. Передача конформационных изменений от сенсора потенциала, делающая возможным открытие поры канала, требует физического взаимодействия между некоторыми а.о.  $S_6$  и линкером между  $S_4$  и  $S_5$  [18, 19]. В  $\alpha$ -субъединицах имеется также цитоплазматический домен, который играет роль в регуляции работы канала, например в инактивации N-типа (см. ниже), а также при тетрамеризации и взаимодействии с  $\beta$ -субъединицами [20].

#### *Механизм работы $K_V$ -каналов*

Механизм работы  $K_V$ -каналов связан с изменением их конформационных состояний. При потенциале покоя  $K_V$ -каналы находятся в закрытой конформации, которая препятствует току ионов. Переход каналов в открытое состояние возможно при изменении мембранного потенциала, который воздействует на заряженные а.о. сенсора потенциала [21]. ТМ спираль  $S_4$  реагирует на изменения потенциала, изменяя конформацию ПЧД, а эти изменения, в свою очередь, передаются на ПД. Пора открывается только тогда, когда активированы все четыре ПЧД [22]. Ионы могут проходить через канал только лишь в открытом состоянии, пока канал не перейдет в закрытое или инактивированное состояние.

Инактивация  $K_V$ -каналов может происходить двумя разными способами, которые называются инактивацией N или C-типа. Суть инактивации N-типа в том, что пора блокируется с внутренней стороны подвижным N-концевым участком  $\alpha$ -субъединицы канала. При этом конформация ПД канала сохраняется как в открытом состоянии [23]. При удалении этого участка инактивация перестает проходить по механизму N-типа, но добавление этого участка в виде отдельной молекулы приводит к возвращению возможности инактивации [24]. Инактивация C-типа является более медленной и может протекать в отсутствие N-концевого участка канала. За этот тип инактивации отвечает участок канала, включающий селективный фильтр, а также N-концевую область  $S_6$  [25]. Инактивация по C-типу протекает за счет конформационных изменений внешнего вестибюля, затрагивающих селективный фильтр канала, что приводит к блокировке тока ионов [26]. Понижение мембранного

потенциала до состояния покоя вызывает переход канала из инактивированного в закрытое состояние. Однако инактивация может быть нарушена в отсутствие  $\beta$ -субъединиц [27].

### *K<sub>v</sub>1-каналы*

В данном разделе рассмотрены известные данные по структурным исследованиям каналов K<sub>v</sub>1. Это подсемейство K<sub>v</sub>-каналов представляет собой интерес, так как является гомологом хорошо изученного канала Shaker *D. melanogaster*, а отдельные его члены широко представлены в нервной системе и участвуют в потенциале действия. Это подсемейство еще называют Shaker-подобными каналами, эта группа каналов встречается у многих живых организмов, а основные особенности их работы схожи среди представителей.

### Структурные исследования K<sub>v</sub>1-каналов

Впервые пространственная структура K<sub>v</sub>-канала млекопитающего с атомным разрешением была получена в работе [12]: методом рентгеноструктурного анализа (РСА) был изучен комплекс K<sub>v</sub>1.2 с  $\beta$ -субъединицей. Было показано, что пора канала похожа на пору прокариотических K<sup>+</sup>-каналов, а также что T1 домен канала взаимодействует с  $\beta$ -субъединицей. В работе [28] с использованием РСА была получена структура канала K<sub>v</sub>1.2 с заменой участка S3–S4 на гомологичный из канала K<sub>v</sub>2.1. Авторы подробно обсудили, как происходит активация канала, какие положительно заряженные а.о. сенсора потенциала доступны из раствора в закрытом и открытом состоянии, и предложили механизм активации канала в ответ на изменение потенциала. Структура химеры K<sub>v</sub>1.2/2.1 была также изучена с помощью криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ) [29]. Было показано, что в нанодисках, которые лучше имитируют природное мембранное окружение канала, его структура отличается от кристаллической [28] незначительно.

Важнейшей работой, посвященной вопросу взаимодействия пептидных поровых блокаторов с K<sub>v</sub>-каналом, является [30]. В ней методом РСА была изучена структура химерного канала K<sub>v</sub>1.2/2.1 в комплексе с харибдотоксином (ChTx). На примере этого комплекса было продемонстрировано, как именно происходит взаимодействие токсина с каналом.

Стремительное развитие метода крио-ЭМ привело к разрешению нескольких структур канала K<sub>v</sub>1.3. Структурные данные, приведенные в работе [31], хорошо

согласуются с данными РСА химеры Kv1.2/2.1 [28]. Кроме того, было исследовано влияние замены H451N на работу Kv1.3 человека, так как в более ранней работе было показано, что аналогичная замена H404N в канале крысы вызывает ускоренную инактивацию по С-типу [32]. Был получен мутант Kv1.3-H451N, который инактивировался в 60 раз быстрее, чем канал дикого типа. Крио-ЭМ структура мутантного Kv1.3 позволила увидеть возможную причину ускорения инактивации по С-типу: в результате замены ослабляется сеть водородных связей, что приводит к расширению внешней части поры с дестабилизацией селективного фильтра. В работе [33] также получили крио-ЭМ структуру канала Kv1.3. Оказалось, что конформация селективного фильтра в данном случае отличается от других структур и, по-видимому, соответствует инактивированному по С-типу состоянию. В частности, остаток Y447 располагается на значительном удалении (11 Å) от аналогичных остатков других каналов. Такое его расположение стабилизировано внутрисубъединичными водородными связями H451–Y447 и H451–D449. В верхней части селективный фильтр расширен, что не дает карбонильным атомам кислорода основной цепи сформировать оптимальные координационные связи с ионами K<sup>+</sup>, что приводит к остановке тока.

Кроме того, был изучен комплекс Kv1.3 с высокоаффинным и высокоселективным поровым блокатором далазатидом (ShK-186) [33], представляющим собой модифицированный токсин ShK из анемоны *Stichodactyla helianthus* и разрабатываемым как лекарство для лечения аутоиммунных заболеваний [34]. В электрофизиологических экспериментах было показано, что ShK-186 связывается с каналом в закрытом или открытом состоянии лучше, чем с инактивированным состоянием. В структуре комплекса Kv1.3 с ShK-186 ворота канала открыты, а его селективный фильтр соответствует закрытому или открытому состоянию. Плотность, соответствующая ShK-186, как и ожидалось, располагается во внешнем вестибуле поры. Плотность, соответствующая ионам K<sup>+</sup>, была обнаружена во всех сайтах селективного фильтра, кроме самого верхнего, с которым, по-видимому, взаимодействует какой-то а.о. пептида. Похожая картина наблюдается в кристаллической структуре комплекса ChTx с химерой Kv1.2/2.1, где остаток K27 ChTx смотрит прямо в пору и взаимодействует с селективным фильтром [30]. Оказывается, что взаимодействие порового блокатора с каналом препятствует его переходу в инактивированное по С-типу состояние.

В третьей работе, посвященной разрешению структуры Kv1.3 с помощью крио-ЭМ, канал также скорее всего находится в инактивированном по С-типу состоянии [35]. В этом случае структура получена без вспомогательной β-субъединицы. Кроме того, Р-петля каждой α-субъединицы принимает две различные конформации в области а.о. Y447 и M450. В связи с этим, было построено две модели (D1 и D2), сравнение которых с другими

структурами показывает, что D2 соответствует инактивированному по С-типу состоянию, а D1 отражает переходное состояние между открытой и инактивированной конформациями. Помимо этого, в данной работе была получена структура комплекса Kv1.3 с пептидом ShK, ковалентно связанного с антителом. Из структуры видно, как остаток K22 ShK блокирует пору канала (Рис. 3), селективный фильтр при этом находится в конформации закрытого или открытого состояния канала.

### Физиологическая роль Kv1-каналов

Важным свойством нервных и мышечных клеток является электровозбудимость, за которую и отвечают потенциал-чувствительные каналы. Основная функция Kv-каналов возбудимых клеток — участие в потенциале действия, а именно в фазе реполяризации, т.е. возвращении мембранного потенциала на уровень потенциала покоя. Однако Kv-каналы встречаются не только в электровозбудимых клетках.

В настоящее время получены убедительные данные, что мембранный потенциал не постоянен во время клеточного цикла: при переходе из G1 в S-фазу во многих типах клеток наблюдается гиперполяризация, а для перехода из G2 в M-фазу, по-видимому, необходима деполяризация [36]. В свою очередь, блокирование ионных каналов приводит к нарушению нормального хода клеточного цикла. Так, нокадаун или ингибирование каналов Kv1.3 и Kv1.5 приводит к аресту клеточного цикла предшественников олигодендроцитов в G1-фазе [37].

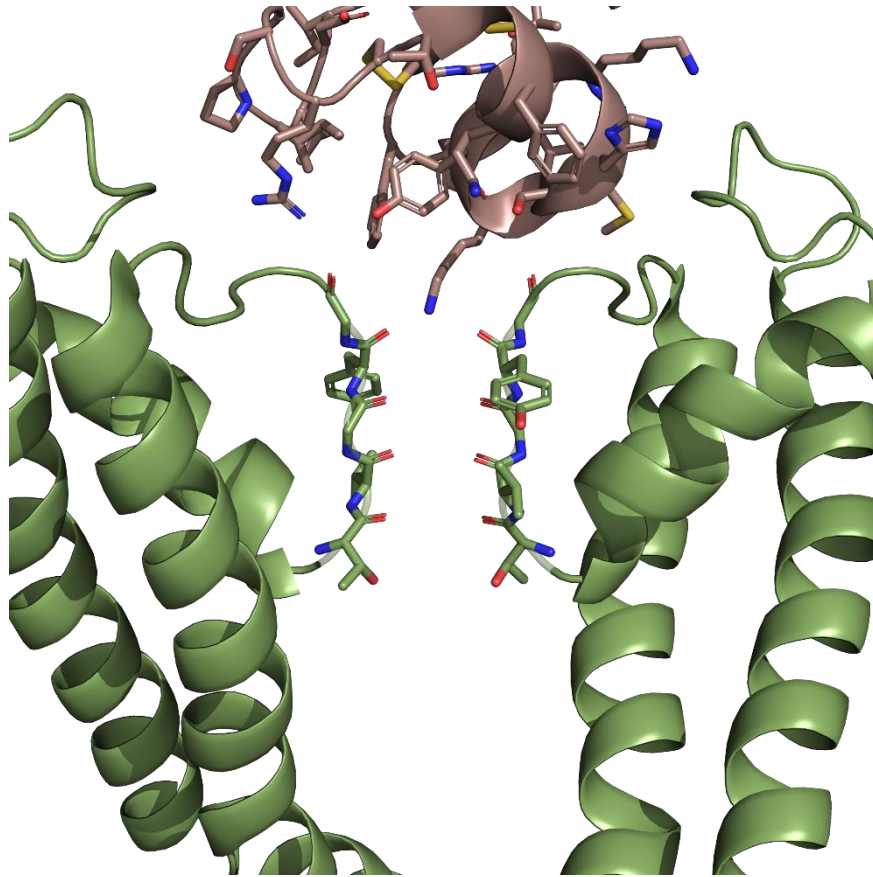


Рисунок 3. Структура комплекса пептида ShK с внешним вестибулем канала  $K_v1.3$ . Пептид окрашен коричневым, канал — зеленым. Боковые цепи а.о. ShK, а также а.о. селективного фильтра представлены в виде стержневой модели. Остальная часть канала и основная цепь пептида — в виде ленточной модели. Две субъединицы канала из четырех не показаны для наглядности.

Также имеются данные об участии канала  $K_v1.3$  в регуляции клеточного объема. При помещении Т-лимфоцитов в гипотонический раствор происходит их набухание, что приводит к открытию АТФ-зависимых хлоридных каналов. Выход ионов  $Cl^-$  приводит к деполяризации мембраны и открытию каналов  $K_v1.3$ . В результате выходящий ток ионов  $K^+$  и  $Cl^-$  приводит к потере воды клетками и возвращению к изначальному объему [38, 39].

В почках  $K_v$ -каналы участвуют в поддержании отрицательного мембранного потенциала во время трансэпителиальной реабсорбции ионов  $Na^+$  переносчиками и амилорид-чувствительными эпителиальными натриевыми каналами (ENaC). При этом  $K_v$ -каналы участвуют и в осморегуляции, предотвращая набухание клеток из-за входящего тока ионов  $Na^+$  [40].

### Медицинское значение Kv1-каналов

Мутации в гене канала Kv1.1 ассоциированы с такими заболеваниями, как эпизодическая атаксия типа 1 (ЭА1). Большая часть мутаций приводит к замене консервативных а.о., что вызывает либо полную утрату функции канала, либо снижение его проводимости. Это приводит к повышению частоты потенциалов действия и неврологическим симптомам, характерным для ЭА1. Созданы животные модели с характерными мутациями для ЭА1. Мыши, у которых отсутствовали оба аллеля *Kcna1*, кодирующие Kv1.1, стали проявлять характерные симптомы, а именно атаксию, миоимию и приступы эпилепсии [41]. В другом исследовании были получены мыши с мутацией V408A. Гомозиготные V408A/V408A мыши умирали на эмбриональной стадии, в то время как гетерозиготные V408A/+ выживали. Для таких мышей была характерна потеря координации, вызванная стрессом. Этот симптом купировался ацетазоламидом так же, как и у больных ЭА1 людей [42].

Помимо этого, Kv1.1 экспрессируются в почках. Было обнаружено, что мутация N255D в этом канале приводит к аутосомно-доминантной гипомагниемии, синдрому, связанному с потерей  $Mg^{2+}$ . В дистальном извитом канальце нефрона Kv1.1 коэкспрессируется с каналом TRPM6, через который идет реабсорбция  $Mg^{2+}$ . Предположительно, Kv1.1 поддерживает отрицательный мембранный потенциал, а мутация N255D приводит к образованию нефункционального канала, что вызывает деполяризацию и негативно сказывается на реабсорбции  $Mg^{2+}$  из первичной мочи [43].

Мутации в гене канала Kv1.2 приводят к таким заболеваниям, как эпизодическая атаксия, наследственная спастическая параплегия и эпилептическая энцефалопатия. В случае энцефалопатии было обнаружено, что мутации могут быть трех типов: с потерей функции, с приобретением функции и одновременно с потерей и приобретением функции [44]. Фенотипически эти три типа похожи, однако в случае мутаций одновременно с потерей и приобретением функции первый приступ эпилепсии приходится на неонатальный период, а в двух других группах он наступал на первый или второй год жизни.

В случае наследственной спастической параплегии была обнаружена мутация высококонсервативного а.о. R294. Он является первым заряженным в сенсоре потенциала (сегменте S4). Замена R294H приводит к току протонов через ПЧД, называемому омега-током. При аналогичной замене в канале Shaker появляется дополнительный ток протонов через мембрану при гиперполяризации, который отсутствует в каналах дикого типа [45].



Таким образом, вызванные мутацией омега-токи, вероятно, и являются причиной заболевания.

Канал  $K_{v1.3}$  является основным  $K^+$ -каналом в эффекторных клетках памяти  $T_{EM}$ . Поскольку при аутоиммунных заболеваниях происходит продолжительное экспонирование аутоантигенов,  $T_{EM}$  клетки играют важную роль в их патогенезе. Было показано, что наблюдается повышенная экспрессия канала  $K_{v1.3}$  в  $T_{EM}$  клетках больных такими аутоиммунными заболеваниями, как рассеянный склероз [46], ревматоидный артрит [47], сахарный диабет первого типа [47], псориаз [48] и гломерулонефрит [49]. В то же время у наивных Т-лимфоцитов и центральных клеток памяти  $T_{CM}$  наблюдается низкая экспрессия  $K_{v1.3}$  [47]. Помимо повышенной экспрессии, начало патологического процесса могут вызывать изменения в работе канала или нарушения субклеточной локализации. Так, изменение распределения  $K_{v1.3}$  в иммунологическом синапсе ассоциировано с системной красной волчанкой [50].

#### Гетеромерные формы $K_{v1}$ -каналов

В предыдущих разделах обсуждались вопросы, посвященные работе и функциям  $K_{v}$ -каналов. Однако все экспериментальные данные для различных  $K_{v1}$ -каналов в основном получены на гомотетрамерных каналах. При этом про  $K_{v}$ -каналы известно, что они могут образовывать гомо- и гетеромерные формы. Это происходит при участии N-концевого T1 (или NAB) цитоплазматического домена  $\alpha$ -субъединиц [51]. При этом образование гетеротетрамеров возможно только при участии  $\alpha$ -субъединиц одного подсемейства, то есть представитель  $K_{v1}$  может образовать гетеромер только с  $K_{v1}$ , но не с  $K_{v2}$  или другими [52].

В ряде работ токсина и/или антитела использовались для изучения субъединичного состава  $K_{v1}$ -каналов. Так, в работе [53] использовались антитела, специфичные к различным изоформам  $K_{v1}$ , для определения субъединичного состава  $K_{v1}$ -каналов в синаптических мембранах мозга быка. Было обнаружено, что среди всех возможных комбинаций из экспрессирующихся в мозге изоформ  $K_{v1}$  встречаются гетеротетрамеры определенного состава, а именно:  $K_{v1.3}$ - $K_{v1.4}$ - $K_{v1.2}$ - $K_{v1.6}$ ,  $K_{v1.1}$ - $K_{v1.2}$ - $K_{v1.6}$ - $K_{v1.1/2/6}$ ,  $K_{v1.1}$ - $K_{v1.2}$ - $K_{v1.1/2}$ - $K_{v1.1/2}$ ,  $K_{v1.4}$ - $K_{v1.4}$ - $K_{v1.4}$ - $K_{v1.4}$ ,  $K_{v1.2}$ - $K_{v1.2}$ - $K_{v1.2}$ - $K_{v1.2}$ .

В другой работе [54] при помощи титьботоксина- $K\alpha$  (TsTX), дендротоксина-К (DTX-K) и тетраэтиламмония (ТЭА) были обнаружены две группы гетеротетрамеров в медиальном ядре трапецевидного тела Варолиевого моста. Все каналы были

нечувствительны к ТЭА в концентрации до 1 мМ и чувствительны к Kv1.1-селективному токсину DTX-K. А TsTX, селективный по отношению к Kv1.2, блокировал только половину каналов. Эти данные говорят о том, что: (i) все каналы содержат субъединицы Kv1.1; (ii) так как ТЭА в указанной концентрации не действует, то нет гомотетрамеров Kv1.1; (iii) половина каналов содержит субъединицы Kv1.2. Иммуногистохимический анализ, в свою очередь, показал высокий уровень экспрессии субъединиц Kv1.1, 1.2 и 1.6. Был сделан вывод, что TsTX-чувствительные каналы состоят из Kv1.1/1.2 субъединиц, а TsTX-нечувствительные — из Kv1.1/1.6.

Если в природе находят ограниченное число вариантов гетеромерных Kv1-каналов из всего спектра возможных, то в искусственных модельных системах, таких как ооциты лягушки *X. laevis*, при совместной экспрессии субъединиц каналов образуется весь возможный спектр вариантов, что затрудняет их изучение. Для обхода этого ограничения используются псевдогетеротетрамеры или конкатемеры — каналы, созданные по подобию Nav-каналов и Cav-каналов. Они в своем составе имеют четыре повтора из шести ТМ сегментов, каждый из которых гомологичен  $\alpha$ -субъединице Kv. Таким образом, можно создать Kv с точно заданной стехиометрией. Эти свойства используются для изучения гетеромерных каналов и лигандов, которые до этого изучались лишь на гомотетрамерах. При помощи конкатемеров было показано, что активация ПЧД всех четырех субъединиц происходит кооперативно, а не независимо друг от друга [55].

### *Селективные лиганды отдельных изоформ Kv1*

Для изучения изоформ каналов, в особенности их физиологической роли, необходимы селективные лиганды, которые воздействуют в определенной концентрации только на одну мишень. Для поиска таких лигандов можно обратиться к базам данных, в которых собраны данные по их активности. Для пептидных блокаторов K<sup>+</sup>-каналов имеется база данных Kalium [56]. В данном разделе будут рассмотрены пептидные поровые блокаторы различного происхождения, которые имеют селективность к той или иной изоформе Kv1.

#### Kv1.1

Известны токсины, проявляющие наибольшую аффинность к изоформе Kv1.1 (Табл. 1). При этом для многих из них не выполнена достаточно широкая фармакологическая

характеристика, позволяющая отнести их к селективным лигандам  $K_v1.1$ . В таблице 1 указаны значения  $K_d$  или полумаксимальной ингибирующей концентрации (ИК<sub>50</sub>). Из указанных в этой таблице соединений можно выделить пептид АРЕКТх1 [57], который проявляет и высокую аффинность, и высокую селективность по отношению к данной изоформе, кроме того, он был протестирован на широкой панели  $K^+$ -каналов.

Таблица 1. Активность известных пептидных лигандов, селективно воздействующих на  $K_v1.1$ . Для пептидов указаны значения  $K_d$  или ИК<sub>50</sub> в нМ.

Лиганд	$K_v1.1$	$K_v1.2$	$K_v1.3$	$K_v1.6$	Источник
Скорпионы					
HgTx1	0,031 <sup>1</sup>	0,17	0,086	6	[58]
BmKTX	2000/100 <sup>2</sup>	2000/73	2000/100	2000/91	[59]
MeKTx13-2	90,3	2677,7	311,7	266,3	[60, 61]
MeKTx13-3	1,9	106	8,9	63,4	[61]
MeKTx1-2	8,5	- <sup>3</sup>	-	-	[60]
ВТК-2	4600	-	-	-	[62]
CoTx2	1000	-	-	-	[63]
PBTx2	1000	-	-	-	[64]
PBTx10	1000	-	-	-	[64]
TstβKTx	96	-	-	-	[65]
HgeScplp1	185	-	-	-	[65]
Актинии					
АРЕКТх1	0,9	> 1000 <sup>4</sup>	> 1000	> 1000	[57]
Bgr1a	6	15	10	-	[66]
Конусы					
ViTx	1590	> 2000	2090	-	[67]
Змеи					
DaE1	300	-	-	-	[68]
Δ-DTX	0,1	-	-	23	[69]
DTX-K	2,5	> 1000	> 1000	> 1000	[70]

<sup>1</sup>  $K_d$  или ИК<sub>50</sub> в нМ;

<sup>2</sup> “А/Б” означает, что в концентрации А нМ пептид блокирует ток через канал на Б процентов;

<sup>3</sup> Нет данных;

<sup>4</sup> Не проявляет активности в указанной концентрации, нМ.

## $K_v1.2$

Общая наблюдаемая тенденция заключается в том, что большинство известных лигандов  $K_v1.2$  не обладают высокой селективностью (Табл. 2). Среди них выделяются уротоксин [71] и мезомартоксин (ММТХ) [72], обладающие высокой аффинностью, однако селективность которых не высока. Напротив, Pi-4 из яда скорпиона *Pandinus imperator* обладает высокой аффинностью, однако активность этого пептида не была исследована в отношении  $K_v1.6$ .

Таблица 2. Активность известных пептидных лигандов, селективно воздействующих на Kv1.2. Для пептидов указаны значения  $K_d$  или ИК<sub>50</sub> в нМ.

Лиганд	Kv1.1	Kv1.2	Kv1.3	Kv1.6	Источник
Скорпионы					
Css20	$> 10^3$	1,3	7,2	- <sup>4</sup>	[73]
Toxin II.10.4	$> 10$	3,6	~72	-	[74]
Toxin II.10.5	$> 10$	0,3	8,3	-	[74]
Toxin II.12.5	$> 10$	0,7	26,2	-	[74]
Toxin II.12.8	4,8	2,9	$> 10$	-	[74]
TsTX-K $\alpha$	1000/85	0,2	1000/85	1000/94	[75, 76]
Tst26	$> 10$	1,9	10,7	-	[77]
Pi-1	$> 5000$	0,44	9,7	-	[78, 79]
Мауротоксин	45	0,8	180	-	[80]
Pi-4	$> 10000$	0,008	$> 10000$	-	[81]
Уротоксин	253	0,16	91	-	[71]
OdK1	$> 400$	183	$> 400$	-	[82]
Kbot1	145	2,5	15	-	[83]
CoTx1	24400	27	5300	-	[84]
OsK-2	$> 250$	97	$> 250$	-	[85]
Ts15	500/10	196	508	500/20	[86]
MMTX	$> 50000$	15,6	12500	-	[72]
Актинии					
Vcs3a	405	0,03	74	1,31	[87]
Vcs4a	3000/54	173	1007	2246	[87]
Конусы					
$\kappa$ -M RIII	~4000	33	~10000	~8000	[88]
$\kappa$ -M RIHK	$> 10000$	280	$> 10000$	5000/10	[89, 90]
Змеи					
$\alpha$ -DTX	9,4	0,38	$> 100$	9	[91–93]
DTX-I	3,1	0,13	4533	10/26	[70, 94, 95]

Условные обозначения аналогичны таблице 1

### Kv1.3

Известно множество пептидных поровых блокаторов, действующих на изоформу Kv1.3 (Табл. 3). Большинство из них составляют токсины, выделенные из яда скорпионов, или их производные. Среди них внимание привлекает HsTX1[R14A] — производное токсина HsTX1, которое обладает пикомолярной аффинностью к целевой изоформе в совокупности с высокой селективностью [96]. Также стоит отметить ShK-170 и ShK-186, которые обладают схожей активностью, при этом ShK-186 (далазатид) проходил клинические испытания как лекарство от псориаза [34].

### Kv1.6

Среди пептидных токсинов известно не так много действующих избирательно на канал Kv1.6. Из таблицы 4 можно увидеть, что они обладают либо высокой аффинностью, но

низкой селективностью, либо наоборот, действуют селективно, но с низкой аффинностью. Из этого списка выделяется конопептид Y-PII [97], который является и высокоаффинным, и селективным, однако не известно, как он действует на канал  $K_v1.1$ .

### Низкомолекулярные лиганды

Первые эксперименты по изучению  $K_v$ -каналов проводились с использованием низкомолекулярных соединений. Основными из них являются ТЭА и 4-аминопиридин (4-АП). Они обладают атомом азота, который в заряженном состоянии имитирует ион  $K^+$ , но не проходят через пору канала, а выступают поровыми блокаторами. Эти низкомолекулярные лиганды  $K^+$ -каналов обладают различной аффинностью к разным изоформам, но их действие проявляется в микро- и миллимолярных концентрациях. Так, по данным, взятым из базы данных IUPHAR (<https://www.guidetopharmacology.org>), среди  $K_v1$  ТЭА действует на  $K_v1.1$ , 1.3, 1.6, 1.7 и 1.8. В свою очередь, 4-АП действует на  $K_v1.2$ , 1.4, 1.5, 1.7 и 1.8. Таким образом, эти вещества можно использовать для различения некоторых изоформ, хотя они и не являются высокоселективными.

На основе низкомолекулярного соединения псоралена из растения *Psoralea corylifolia* был создан ряд веществ, действующих на канал  $K_v1.3$ . Среди них самым активным является Psora-4, полумаксимальная эффективная концентрация ( $ЭК_{50}$ ) которого составила  $\approx 3$  нМ. Однако, он не является высокоселективным лигандом, так как  $ЭК_{50}$  по отношению к каналу  $K_v1.5$  составила  $\approx 8$  нМ [98]. Также интересно то, что коэффициент Хилла для Psora-4 равен двум, в отличие от классических пептидных поровых блокаторов, где он равен единице. Вероятно, что с одним каналом связывается не одна, а две молекулы, однако на данный момент не известно, как именно они связываются. Эксперименты с производными Psora-4 позволили предположить, что в механизме взаимодействия лиганда с каналом играют важную роль два стэкинг-взаимодействия.

Корреолид представляет собой сложное низкомолекулярное соединение из дерева *Spathaea correae* с пятью ацетокси- и одной эпокси-группой [135]. Он является  $K_v1.3$ -селективным блокатором с  $ИК_{50} \approx 86$  нМ. При этом обратимость взаимодействия говорит о том, что он не связывается ковалентно с каналом. В свою очередь, эксперименты с вытеснением маргатоксина (MgTx) показали, что стехиометрия связывания 1:1. Однако корреолид является низкоселективным блокатором  $K_v1.3$ . Так,  $ИК_{50}$  для  $K_v1.1$ , 1.2, 1.5 и 1.6 составили 430, 700, 1150 и 450 нМ соответственно [136].

Таблица 3. Активность известных пептидных лигандов, селективно воздействующих на Kv1.3. Для пептидов указаны значения  $K_d$  или  $IK_{50}$  в нМ.

Лиганд	Kv1.1	Kv1.2	Kv1.3	Kv1.6	Источник
Скорпионы					
ChTX	1500 <sup>1</sup>	9	0,19	22	[99, 100]
BmTX1	- <sup>2</sup>	-	1,5	-	[101]
BmTX2	-	-	1,6	-	[101]
PBTx3	79000	547	492	-	[102]
NTx	>25 <sup>3</sup>	2	1	-	[103]
Ce1	-	-	0,7	-	[104]
Ce2	-	-	0,25	-	[104]
Ce3	-	-	366	-	[104]
Ce4	-	-	0,98	-	[104]
Ce5	-	-	69	-	[104]
KTX-1	1,1	20	0,1	-	[100]
AgTx2	2	500/100 <sup>4</sup>	9	92	[105]
AgTx1	136	-	1,7	149	[99]
ADWX-1	-	-	0,002	-	[106]
OsK1	72	1000/100	6	71	[105]
OdK2	>35	>35	7,2	>35	[107]
Aam-KTX	>750	10,4	1,1	-	[108]
MeuKTx-3	0,203	8,92	0,171	2000/93	[59]
HsTX1	7	>100	0,012	-	[109, 110]
HsTX1[R14A]	100/20	-	0,045	-	[96]
Ануроктоксин	>10	6,14	0,73	-	[111]
Гемитоксин	13	16	2	-	[112]
BmP01	467	>3000	133	>3000	[113]
MeuTXKa1	3000/35	>3000	2,36	>3000	[113]
BmP02	1950	4400	7	-	[114]
BmP03	5480	530	85,4	-	[114]
Парабутоксин-1	21000	1000	800	-	[64]
J123	1000/20	26,4	0,8	-	[115]
Sp4	1000/21	1000/7	24,73	-	[116]
Ts6	1000/9	6,19	0,55	1000/20	[75]
LmKTx10	1700	12500	28	-	[117]
Ctri9577	1000/7	1000/22	0,49	-	[118]
MeuKTx-4	>2000	>2000	2000/20	>2000	[119]
Sp2	485	57	14,7	-	[120]
Tt28	>500	102	7,9	-	[121]
Vm24	0,8	0,54	0,003	-	[122]
Pi5	>100	92	77	-	[123]
Ev37	>1000	>1000	950	-	[124]
Hg1	1000/45	1000	6,2	-	[125]
κ-HfTx1	>40000	150000	40000	-	[126]
Актинии					
ShK	0,016	9	0,011	165	[127]
ShK-170	7	48	0,07	18	[128]
Змеи					
Кротамин	369	386	287	>3000	[129]
Плектасин	1000/16	1000/4	2800	1000/3	[130]

Условные обозначения аналогичны таблице 1

UK-78,282 представляет собой пиперидиновое производное, которое позиционируется как блокатор канала Kv1.3 и потенциальный агент, действующий на Т-лимфоциты,  $IK_{50}$  составила  $\approx 280$  нМ. В частности, оно действует на сердечные кальциевые каналы в  $\approx 20$  раз хуже [137]. Однако UK-78,282 обладает еще большей аффинностью к

каналу  $K_v1.4$  ( $\approx 170$  нМ), что делает его неселективным, а возможность его использования как препарата против аутоиммунных заболеваний вызывает сомнения.

Таблица 4. Активность известных пептидных лигандов, селективно воздействующих на  $K_v1.6$ . Для пептидов указаны значения  $K_d$  или  $IK_{50}$  в нМ.

Лиганд	$K_v1.1$	$K_v1.2$	$K_v1.3$	$K_v1.6$	Источник
		Скорпионы			
Kbot21	1000/100 <sup>1</sup>	1000/100	1000/100	76 <sup>2</sup>	[131]
HelaTx1	9900	30000/5	30000/20	30000/60	[132]
		Анемоны			
AbeTx1	672	167	3000/20	116	[133]
$\kappa$ -Актитоксин Vcs3b	14	80	13	8	[87]
		Конусы			
Конопептид Y-Fe1	<sup>3</sup>	$>30000^4$	$>50000$	8800	[97]
Конопептид Y-PI1		2000	$>50000$	170	[97]
$\alpha/\kappa$ -Конотоксин pI14a	$>1000$	$>1000$	$>1000$	1590	[134]

Условные обозначения аналогичны таблице 1

### 1.3 Токсины из яда скорпионов, действующие на $K^+$ -каналы

#### 1.3.1 Пептидные токсины из яда скорпионов

Предложено несколько классификаций полипептидных токсинов, выделенных из яда скорпионов. Например, согласно одной классификации, токсины разделяют по длине, и выделяют две группы: длинные, содержащие 60–75 а.о., и короткие, которые содержат 25–40 а.о. [138]. По другой классификации токсины разделяют согласно мишеням их действия. Так, например, выделяют млекотоксины, которые действуют на млекопитающих, инсектотоксины, которые действуют на насекомых, и токсины, которые действуют на обе эти группы животных. Также токсины из яда скорпионов можно классифицировать по типу укладки, по количеству дисульфидных связей и по молекулярной мишени. При использовании вышеперечисленных критериев полипептидные токсины скорпионов разделили на несколько групп: токсины, действующие на  $Na^+$ -каналы, токсины, действующие на  $K^+$ -каналы, короткие инсектотоксины и другие малочисленные группы.

#### *Токсины, действующие на $K^+$ -каналы*

В настоящее время ученым известно около 250 токсинов скорпионов, специфично блокирующих  $K^+$ -каналы (КТх). Они представляют собой пептиды из примерно 20–40 а.о., стабилизированные дисульфидными связями. Существует несколько подходов к классификации КТх. Так, один из них основывается на сходстве аминокислотных

последовательностей и пространственной структуры; тогда выделяют следующие группы:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\lambda$  и  $\kappa$ -КТх (Рис. 4). Самой большой группой являются  $\alpha$ -КТх, они обладают пространственной укладкой цистеин-стабилизированных  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -слоя (CS $\alpha/\beta$ ).  $\beta$ -КТх состоят из двух доменов: N-концевого домена, имеющего структуру  $\alpha$ -спирали и обладающего цитолитическим и/или антимикробным действием, и C-концевого домена, который отвечает за функционирование токсина в отношении K<sup>+</sup>-каналов и имеет укладку типа CS $\alpha/\beta$  [139].  $\gamma$ -КТх по большей части действуют на каналы Kv11, также имея укладку типа CS $\alpha/\beta$ . [140].  $\kappa$ -КТх имеют укладку цистеин-стабилизированных  $\alpha$ -спиралей CS $\alpha/\alpha$  и отличаются низкой активностью [141].

#### *Функциональные детерминанты КТх*

В настоящее время имеется массив данных о том, как работают КТх. Существуют как структурные данные, например комплекс ChTx с химерным каналом Kv1.2/2.1 [30], рассматриваемый ранее, так и данные мутагенеза ChTx и других токсинов. Если проанализировать эти данные, то можно выделить важные для работы токсинов а.о., например K27 у ChTx, замена которого приводит к падению аффинности, а в структуре комплекса ChTx–Kv1.2/2.1 он физически затыкает пору канала (Рис. 5). Анализ структурных данных и мутагенеза позволил предложить ряд гипотез о том, как происходит взаимодействие КТх с каналами.

#### *Функциональная диада*

В частности, для объяснения взаимодействия поровых блокаторов с калиевыми каналами была предложена гипотеза «функциональной диады». Она заключается в том, что существует пара функциональных а.о. на расстоянии  $6,6 \pm 1 \text{ \AA}$  — лизин и тирозин/фенилаланин/лейцин, которые обеспечивают блокирование тока через канал. Боковая цепь лизина в этом случае имитирует ион K<sup>+</sup> и взаимодействует с селективным фильтром, вызывая закупорку канала. Второй ароматический/гидрофобный остаток взаимодействует с вестибюлем канала и обеспечивает посадку токсина в пору.



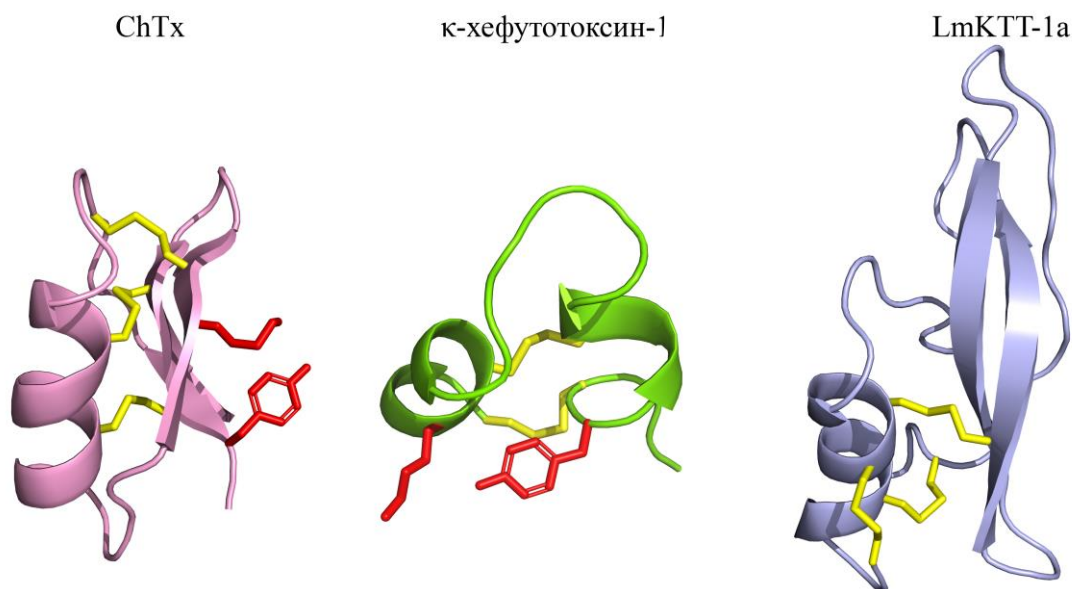


Рисунок 4. Некоторые представители КТх. Слева показан харибдотоксин (ChTx из семейства  $\alpha$ -КТх), посередине —  $\kappa$ -хефутотоксин-1 ( $\kappa$ -КТх), справа — LmKTT-1a ( $\delta$ -КТх). Желтым цветом показаны дисульфидные связи, красным — боковые цепи а.о. функциональной диады.

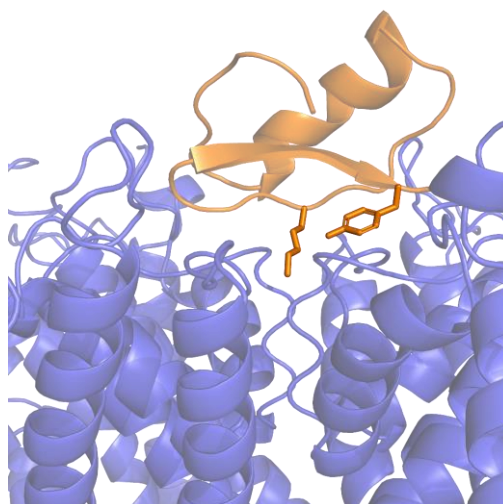


Рисунок 5. Кристаллическая структура комплекса ChTx и химерного канала Kv1.2/2.1. Канал покрашен синим цветом, ChTx — оранжевым. Структура канала и токсина показана ленточными моделями, боковые цепи ключевых а.о. функциональной диады показаны стержневой моделью.

Влияние отдельных а.о. поровых блокаторов на связывание с каналом было показано на примере ChTx с помощью внесения одиночных аминокислотных замен [142, 143]. Пять замен вызвали сильное снижение аффинности по отношению к каналу Shaker, а наибольшим эффектом обладала замена K27. Соответствующие а.о. (K27, M29, N30, R34 и Y36) расположены в  $\beta$ -слое ChTx и формируют единую поверхность. В настоящее время принято, что диаду в ChTx образуют остатки K27 и Y36 (Рис. 5).

При выравнивании аминокислотных последовательностей  $\alpha$ -КТх можно обнаружить, что не все токсины имеют ароматический а.о. в сходном положении с Y36 у ChTx. Так, у калиотоксина (КТх) из яда скорпиона *Androctonus mauritanicus mauritanicus* и трех агитоксинов (AgTx<sub>1-3</sub>) из яда скорпиона *Leiurus quinquestriatus hebraeus* в этом положении находится остаток T36. Однако при анализе пространственных структур можно обнаружить остаток фенилаланина на поверхности  $\beta$ -слоя вблизи от лизина диады. Мутационный анализ показал, что в AgTx<sub>2</sub> остаток F25 играет важную роль во взаимодействии с каналом. А в случае, если наложить пространственные структуры AgTx<sub>2</sub> и ChTx, то можно увидеть, что остатки F25 и Y36 соответственно накладываются друг на друга при повороте токсинов на 90°. Таким образом, по всей видимости, диада AgTx<sub>2</sub> взаимодействует с теми же остатками, что и диада ChTx, но с разными мономерами, благодаря симметрии канала.

Известно, что филогенетически далекие друг от друга животные (змеи, скорпионы, конусы и морские анемоны) производят токсины, действующие на различные K<sub>v</sub>-каналы. Они друг от друга довольно сильно отличаются аминокислотным составом, размером и укладкой, характерными для разных групп животных. Соответственно, возникает вопрос: имеется ли между ними что-либо общее, что позволяет им взаимодействовать с одним и тем же сайтом каналов?

Ответом на вышестоящий вопрос может являться функциональная диада. Если предположить, что в токсине VgK из яда анемоны *Bunodosoma granuliferum* остаток лизина K25 выполняет ту же функцию, что и K27 у ChTx, то можно наложить эти структуры так, что остаток Y26 VgK накладывается на Y36 диады из ChTx. После наложения можно вокруг лизина повернуть ChTx на 90°, и в этом случае на Y36 диады накладывается другой ароматический остаток F6. При замене этих двух а.о. (F6A и Y26A) наблюдается значительное падение аффинности VgK (в случае F6A оно больше), что указывает на их важность. Таким образом, можно говорить о конвергентном образовании функциональной диады в эволюционно далеких токсинах [144].

У дендротоксинов (DTx) змей при помощи мутагенеза также был определен ключевой остаток лизина [145, 146]. Этот а.о. находится в N-концевой области (K3 или K5) и экспонирован. Однако у  $\alpha$ DTx отсутствует характерный ароматический а.о. диады, который характерен для токсинов скорпионов и анемонов на расстоянии 6,6 Å. При этом у него имеется важный остаток L9 на расстоянии около 6,9 Å [146].

### Другие функциональные детерминанты

Многие исследования показывают, что не только а.о. функциональной диады важны для связывания токсинов с каналами. Например, замена а.о. диады у мауротоксина (MTX) привела к падению аффинности, но не полному ее исчезновению [147]. Некоторые токсины могут не иметь диады, при этом показывая высокую аффинность к  $K_v1$ -каналам. Например, токсин Tc32 не имеет остатков диады при высокой аффинности к каналу  $K_v1.3$  [148]. Можно предположить, что функциональная диада повышает аффинность, а для узнавания и связывания с порой канала необходимы другие а.о.

Для объяснения размещения токсина в поре канала предложена гипотеза «кольца основных остатков». Такое кольцо сформировано а.о. лизина и аргинина, расположенными на интерфейсе взаимодействия токсина с каналом. Пример влияния этих остатков на связывание с каналом можно увидеть в экспериментах, проводившихся на токсине Pi1 из яда скорпиона *P. imperator*, который действует на канал  $K_v1.2$  в наномолярной концентрации [149]. При замене одного или нескольких а.о., входящих в это кольцо, на аланин наблюдали падение аффинности в 50–480 раз, то есть эти остатки взаимодействуют с вестибюлем поры  $K_v1.2$ . Но поскольку замена одного или двух а.о. не приводит к полному исчезновению активности Pi1, стабильный комплекс образуется и при меньшем количестве положительно заряженных а.о.

Из структурных данных известно, что вестибюль поры каналов  $K_v1$  заряжен отрицательно [30]. Поэтому неудивительно, что поверхность, которой токсины взаимодействуют с каналами заряжена в общем положительно, особенно в области  $\beta$ -слоя, который считается самым важным для действия токсинов. Однако существуют токсины, общий заряд которых отрицателен. Один из таких токсинов, PBTx1, помимо заряда, отличается отсутствием функциональной диады [64]. Сам по себе он действует на  $K_v1$ -каналы в микромолярных концентрациях. В работе [64] было решено при помощи мутагенеза «восстановить» диаду в соответствующих положениях. Введение замен T24F и V26K привело к увеличению

аффинности в 8–20 раз на разных изоформах  $K_v1$ . PBTx1 и его мутант с диадой оказывают лучшее действие на канал  $K_v1.3$ . Это можно связать с тем, что  $K_v1.1$  и  $1.2$  в поровом регионе имеют пять отрицательно заряженных а.о., в то время как  $K_v1.3$  — только четыре.

$\alpha$ -КТх могут быть активными как на  $K_v1$ , так и на  $K_{Ca}$ -каналах. ChTx и ибериотоксин (IbTx) относятся к группе  $\alpha$ -КТх1. При этом ChTx проявляет активность к двум вышеуказанным группам, в то время как IbTx действует только на  $K_{Ca}$ -каналы. Эти токсины различаются пятью а.о., однако уже одной замены G30N достаточно, чтобы IbTx стал проявлять активность на  $K_v1.3$  в концентрации 300 нМ. При анализе аминокислотных последовательностей можно увидеть, что остаток аспарагина в этом положении довольно консервативен, а если в этом месте встречается другой а.о., то соответствующие КТх не активны на  $K_v$  [150].

#### Детерминанты селективности

Для множества токсинов известно, что они обладают схожей пространственной структурой. Следовательно, различия в их активности на разные каналы заключены в первичной последовательности. Выше уже обсуждались ключевые а.о., обеспечивающие взаимодействие КТх с  $K_v$ .

Благодаря мутагенезу как каналов, так и токсинов, по изменению активности последних можно предположить, взаимодействуют ли остатки друг с другом. Например, для ноксиустоксина (NTx) при помощи мутагенеза было показано, что последние а.о. на С-конце (YNN) необходимы для взаимодействия с  $K_v1.1$  [151].

В другой работе было показано, что при понижении pH происходит снижение аффинности к  $K_v1.3$  у ChTx и калиотоксина (КТх), но не у NTx или MgTx. Это вызвано тем, что при понижении pH происходит протонирование H404, который находится в устье поры канала, и это приводит к отталкиванию заряженного а.о. токсина. Этим а.о. может являться R25 у ChTx и R24 у КТх. При этом R24 у КТх взаимодействует с D386, что было показано на мутанте D386A, аффинность к которому у токсина падает [152].

Примером направленного создания селективного лиганда путем внесения замен а.о. является пептид ADWX-1. В качестве шаблона выступил токсин VmКТх, который является хорошо изученным пептидом. В нем произвели три аминокислотных замены, каждая из которых должна привести к увеличению аффинности с каналом  $K_v1.3$ . Так, замена D33N была выбрана потому, что остаток гистидина в этом положении является консервативным для

группы  $\alpha$ КТх3. Замена I28T должна привести к более выгодному взаимодействию пептида с каналом. В свою очередь, замена G11R должна привести к образованию дополнительных солевых мостиков, так как в S5–P регионе Kv1.3 имеется четыре отрицательно заряженных остатка. В результате полученный пептид оказался в 100 раз более аффинным, чем VmКТх. Помимо этого, ADWX-1 оказался высокоселективным к Kv1.3, ИК<sub>50</sub> для Kv1.1 в 340 раз выше, а по отношению к Kv1.2 это значение еще больше. В свою очередь аланиновый скрининг показал, что важными для связывания ADWX-1 с Kv1.3 являются положительно-заряженные а.о. R11 и R23, а также F24 [106].

### *Сходство токсинов скорпионов и дефензинов*

Антимикробные пептиды (АМП) играют важную роль во врожденном иммунитете многоклеточных организмов [153–156]. Используя различные механизмы, АМП препятствуют росту патогенных микроорганизмов путем разрушения плазматических мембран и / или действуя на внутриклеточные мишени [157–159]. Исследования АМП, в частности, направлены на поиск высокоэффективных и безопасных средств борьбы с болезнями растительных культур, вызванных фитопатогенными бактериями и грибами.

Дефензины являются группой АМП и играют важную роль как компонент врожденного иммунитета, в частности у беспозвоночных [160, 161]. Очевидно, что эволюция токсинов представляет успешную стратегию экологической адаптации животных, но не ясно, где и как токсины возникли. Считается, что токсины произошли от полипептидных молекул с физиологическими функциями. С этим предположением хорошо согласуется то, что многие пептидные токсины, действующие на ионные каналы, и антимикробные дефензины обладают схожими пространственными структурами (например  $CS\alpha/\beta$ , цистиновый узел) [162–164]. Комбинация эволюционных и структурных данных также подтверждает сходство между АМП и дисульфид-содержащими токсинами [165]. Была выдвинута гипотеза, что токсины скорпионов и антимикробные дефензины беспозвоночных имеют общего предшественника [162, 166].

По пространственному строению дефензины беспозвоночных можно разделить на две структурно различающиеся части: конформационно гибкую петлю (n-петлю), за которой следует структура  $CS\alpha/\beta$ , похожая на таковую у  $\alpha$ -КТх [167]. Функциональная значимость n-петли для антимикробной активности была установлена в результате ее удаления [168] и при создании гибридного дефензина [169]. Было показано, что при удалении n-петли

у дефензинов падает антимикробная активность, так как эта петля повышает сродство дефензина к отрицательно заряженной бактериальной мембране.

В работе Чжу и др. была построена карта встречаемости а.о. в структурах  $\alpha$ -КТх, были выделены восемь структурно и функционально важных а.о., консервативных для всего семейства и названных «мотивом токсинов скорпионов» [170]. Ими оказались шесть остатков цистеина, которые образуют три дисульфидные связи, а также остатки лизина и аспарагина, которые образуют мотив из четырех а. о. вокруг четвертого цистеина (K-C<sup>4</sup>-X-N, X — любой а.о.). Замена лизина и аспарагина приводит к сильному снижению силы связывания AgTx<sub>2</sub> K<sup>+</sup>-каналом дрозофилы Shaker [99, 171]. В этой же работе были проанализированы дефензины насекомых из шести отрядов (Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Lepidoptera и Phthiraptera). Оказалось, что дефензины, имеющие в своем составе мотив токсинов скорпионов, присущи двум отрядам, среди которых известны ядовитые насекомые: Hemiptera и Hymenoptera. Эти отряды не близкородственные, поэтому эволюция мотива токсинов скорпионов имеет конвергентную природу.

По-видимому, n-петля в структуре дефензинов стерически препятствует их взаимодействию с K<sup>+</sup>-каналами. Для подтверждения этой гипотезы был выбран навидефензин-2, выделенный из ядовитых желез *Nasonia vitripennis*, который имеет в своей структуре мотив токсинов скорпионов. На основании сравнения аминокислотной последовательности навидефензина-2 с классическими  $\alpha$ -КТх была удалена n-петля из его структуры, такое производное получило название навитоксин. Оказалось, что этот пептид обладает блокирующим действием на каналы Kv1.1 и 1.3, при этом не оказывает эффекта на другие Kv-каналы [170]. Таким образом, было показано, что из молекулы, не имеющей активности на K<sup>+</sup>-каналы, путем аминокислотных замен можно сделать поровый блокатор.

#### *Сходство токсинов скорпионов и $\alpha$ -гарпининов*

$\alpha$ -Гарпинины представляют собой группу защитных пептидов растений, которые содержат две антипараллельные  $\alpha$ -спирали, стабилизируемые двумя дисульфидными связями (CS $\alpha$ / $\alpha$ ). Одним из таких пептидов является Tk-AMP-X2, выделенный из пшеницы *Triticum kiharae* [172]. Он состоит из 28 а.о., четыре из которых — остатки цистеина, образующие две дисульфидные связи и два мотива CX<sub>3</sub>C. В структурном отношении Tk-AMP-X2 очень похож на к-хефутоксин-1 (Рис. 6), при этом он выполняет совершенно иные функции и не обладает активностью в отношении известных K<sup>+</sup>-каналов.

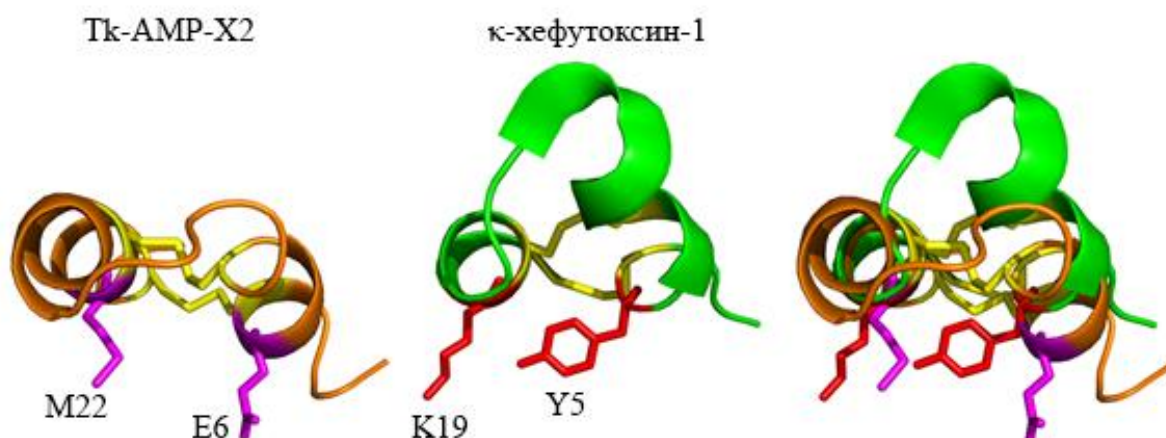


Рисунок 6. Пространственная структура Tk-AMP-X2, κ-хефутоксина-1 и их сравнение. Желтым показаны дисульфидные мостики, красным — боковые цепи функциональной диады κ-хефутоксина-1 (K19 / Y5), соответствующие остатки в Tk-AMP-X2 (M22 / E6) выделены розовым.

На основании сходства с κ-хефутоксином-1 было предложено использовать Tk-AMP-X2 в качестве основы для получения новых блокаторов  $K^+$ -каналов. Для этого в его структуру была введена функциональная диада [173]. В результате были получены производные Tk-hefu-1 и Tk-hefu-2 (Табл. 5). Оба пептида проявляли активность на каналах  $K_v1.2$ , 1.3 и 1.6, как и κ-хефутоксин-1 [174]. При этом активность Tk-hefu-2 оказалась в 20 раз больше, чем у исходного токсина [175].

Таблица 5. Сравнение аминокислотных последовательностей κ-хефутоксина-1, Tk-AMP-X2 и производного Tk-hefu. Желтым цветом выделены остатки цистеина, красным — функциональная диада.

Пептид	Последовательность	Длина, а.о.
κ-хефутоксин-1	-GHAC $\square$ YRNC $\square$ WR--EGNDEET $\square$ KER $\square$ C---	22
Tk-AMP-X2	ADDR $\square$ ERM $\square$ QRYHDRREKKQ $\square$ CMKG $\square$ CRYG	28
Tk-hefu-1	ADDR $\square$ YRM $\square$ QRYHDRREKKQ $\square$ CKEG $\square$ CRYG	28
Tk-hefu-2	ADDR $\square$ YRM $\square$ QRYHDRREKKQ $\square$ CKKG $\square$ CRYG	28

#### 1.4 Резюме

K<sub>v</sub>-каналы представляют интерес как объекты исследования, так как они широко распространены в организме человека и принимают участие в передаче нервного импульса, регуляции клеточного объема, апоптозе и других процессах. В частности, наше внимание привлекает подсемейство K<sub>v</sub>1, его представители могут образовывать как гомо-, так и гетеромерные каналы. Для их изучения нужны селективные лиганды, которые могут узнавать отдельные изоформы. В данный момент существует ряд таких селективных лигандов, однако они либо не обладают достаточной аффинностью, либо селективностью. Помимо этого, не всегда понятно, какие а.о. необходимы для селективного связывания с отдельными изоформами каналов. Поэтому получение селективных лигандов имеет важное значение, например для изучения каналов, мутации в которых приводят к возникновению различных заболеваний. Такие лиганды могут позволить пролить свет на функционирование мутантных каналов и рассматриваются в качестве перспективных фармакологических агентов.



## 2. Материалы и методы

### 2.1 Материалы

#### 2.1.1 Оборудование и расходные материалы

Автоматические пипетки на 20, 100, 200, 1000 мкл (Gilson, Франция), амплификатор S1000 (Bio-Rad, США), банки стеклянные с крышкой объемом 300 и 500 мл (Биолаб, Россия), вакуумный концентратор CentriVar (Labconco, США), вакуумный насос 117 LPM (Labconco), весы настольные (Sartorius, США), встряхиватель пробирок Lab dancer (ИКА, Германия), газовая горелка (Биолаб), гомогенизатор высокого давления Emulsi Flex-B15 (Avestin, Германия), градиентный хроматограф 1525 (Waters, США), деионизатор воды Milli-Q UF Plus (Millipore, США), детектор проточный двуволновой 2489 (Waters), источник питания для электрофореза 2301 (ЛКВ-Bromma, Швеция), камера для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN Tetra Cell Systems (Bio-Rad), камера для горизонтального электрофореза Mini-sub cell GT cell (Bio-Rad), колба с фильтром для водоструйной фильтрации растворов (Millipore, Германия), колбы качалочные стеклянные на 500 и 1000 мл Кн-2-1000-42 (Стеклоприбор, Россия), колбы стеклянные на 200, 300 и 500 мл (Стеклоприбор), колонка для аффинной хроматографии Econo-Pac (1,5×12 см, Bio-Rad), колонки хроматографические Jupiter C<sub>5</sub> (150×2,0 мм, 250×4,6 мм с диаметром пор 300 Å и размерами частиц 5 мкм; 250×10 мм с диаметром пор 300 Å и размерами частиц 10 мкм, Phenomenex, США), кюветы кварцевые (Quartz SUPRASIL; Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, Germany), кюветы для спектрофотометрии Quartz SUPRASIL (Shimadzu, Япония), кюветы для электропорации 400 мкл, расстояние между электродами 2 мм (Eppendorf, Германия), ламинарный шкаф (Gelaire, Австралия), ледогенератор (Scotsman, Италия), магнитная мешалка КМО2 (ИКА), микроинжектор Nanoject II (Drummond Scientific, США), масс-спектрометр Ultraflex TOF-TOF (Bruker Daltonik, США), наконечники для пипеток (Bio-Rad), низкотемпературный морозильник Innova (New Brunswick, США), охлаждаемая ловушка CentriVar (Labconco), парафиновая пленка (Pechiney Plastic Packaging Company, США), петля микробиологическая (Биолаб), полиакриламидные коммерческие гели для белкового электрофореза 12% Mini-PROTEAN TGX (Bio-Rad), прибор для лиофильной сушки FreeZone 2.5 (Labconco), прибор для измерения pH растворов pH-420 (Аквилон, Россия), пробирки пластиковые объемом 0,65 и 1,7 мл (Costar, США), пробирки пластиковые объемом 0,2 и 2 мл (SSI, США), пробирки пластиковые объемом 15, 50 мл (Corning, США), скальпель металлический (Биолаб), спектрополяриметр J-810 (JASCO, Япония), спектрофотометр UV-1800 (Shimadzu), стаканы стеклянные объемом 200, 1000 и 2000 мл (Биолаб), стерилизатор паровой (ТЗМОИ, Россия),

термомиксер 5436 (Eppendorf), термостат BT-120 (BioSan, Латвия), термостатический шейкер (Lab-line Instruments, США), термостат напольный CERTOMAT (Sartorius), ультразвуковой дезинтегратор Ultrasonic processor CPX 750 (Cole-Parmer Instruments, США), центрифуга Minispin (Eppendorf), центрифуга 5417R (Eppendorf), центрифуга 5804R (Eppendorf), центрифужные пробирки для выделения ДНК в составе наборов (Fermentas, Thermo Scientific), чашки Петри пластиковые (Ленинградский завод медицинских полимеров, Россия), шейкер Innova 2000 (New Brunswick), шпатель Дригальского микробиологический (Биолаб), шпатель металлический (Биолаб), шприцы пластиковые (Becton Dickinson, США), электропоратор 2510 (Eppendorf), электрофизиологическая установка Geneclamp 500 (Molecular Devices, США), электрофизиологический биоусилитель Digidata1200 (Axon Instruments, США).

### 2.1.2 Реактивы

Агар (FERAK, Германия), агароза LE2 (Helicon, Россия), аденозинрибонуклеотидтрифосфат (АТФ; Fermentas, Канада), ампициллин (Синтез, Россия), ацетонитрил ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ; Криохром, Россия), бактотриптон (Difco, США), бромистый этидий (Sigma), гидроксид натрия ( $\text{NaOH}$ ; Химмед, Россия), гидроксид калия ( $\text{KOH}$ ) (Химмед), 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES; ICN, США), гидрофосфат натрия ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; Sigma), гликоген (Fermentas), глицерин (Panreac, Испания), глицин (ICN), глюкоза (Биохимик, Россия), 2,5-дигидроксибензойная кислота (Sigma), дигидрофосфат натрия ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; Sigma), ДНК-лигаза бактериофага T4 (Thermo Scientific), ДНК-полимераза Taq (Евроген, Россия), ДНК-маркеры длин в диапазоне 100 – 1000 пар оснований (п.о.; Fermentas), ДНК-маркеры длин в диапазоне 250 – 10000 п.о. (Fermentas), додецилсульфат натрия (SDS) (Химмед), дрожжевой экстракт (Difco), жидкий азот (Криотрейд, Россия), изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) (Fermentas), изопропиловый спирт (Sigma), имидазол (Диаэм, Россия), краска для нанесения образцов в агарозный гель с содержанием бромфенолового синего ( $6\times$  Loading Dye) (Fermentas), кумасси G-250 (Pierce, США), 2-меркаптоэтанол (Sigma), 3-(N-морфолино)пропансульфоновая кислота (MOPS; Sigma), 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота (MES; Sigma, США), плазмидный вектор pET-32b (Novagen, США), плазмидный вектор pSP64T (Addgene, США), рибонуклеаза А (Thermo Scientific), смесь дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dNTPs; Евроген), соляная кислота ( $\text{HCl}$ ; Химмед), сорбент для металл-хелатной аффинной хроматографии Cobalt Resin HisPur (Thermo Scientific), стандарты для белкового электрофореза (Amersham, США), сульфат магния

(MgSO<sub>4</sub>; Sigma), трис-(гидроксиметил)аминометан (Трис; Sigma), трифторуксусная кислота (ТФУ; Panreac), тритон X-100 (Sigma), уксусная кислота (CH<sub>3</sub>COOH; Химмед), хлорид калия (KCl; Sigma), хлорид кальция (CaCl<sub>2</sub>; Sigma), хлорид магния (MgCl<sub>2</sub>; Sigma), хлорид марганца (MnCl<sub>2</sub>; Sigma), хлорид натрия (NaCl; Sigma), эндонуклеаза рестрикции BamHI (Fermentas), эндонуклеаза рестрикции KpnI (Fermentas), легкая цепь энтеропептидазы человека (ИБХ РАН), этилендиаминтетраацетат натрия (ЭДТА; Sigma), этиловый спирт (Химмед), яд скорпиона *Mesobuthus eupeus*.

### 2.1.3 Растворы

Приготовление всех растворов и суспензий на водной основе производилось с использованием деионизированной воды Milli-Q UF Plus (Millipore), имеющей сопротивление 18,2 МОм.

Буферные растворы для проведения аффинной хроматографии:

1. стартовый буфер: 20 мМ Трис-HCl, 300 мМ NaCl, pH = 8,0;
2. промывочный буфер: 20 мМ Трис-HCl, 500 мМ NaCl, 5 мМ имидазол, 5% глицерин, 0,1% Тритон X-100, pH = 8,0;
3. элюирующий буфер: 20 мМ Трис-HCl, 300 мМ NaCl, 150 мМ имидазол, pH = 8,0;
4. раствор для регенерации сорбента: 20 мМ MES;
5. раствор для хранения: 20% этиловый спирт.

Растворы для проведения обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ):

1. раствор А: 0,1% ТФУ в воде;
2. раствор В: 0,1% ТФУ в ацетонитриле.

Питательная среда LB (на 1 литр H<sub>2</sub>O): 10 г бактотриптон, 5 г дрожевой экстракт, 10 г NaCl, 1,2 г Трис, pH = 7,5. Для получения твердой среды необходимо добавить 15 г агара на 1 литр жидкой.

Буферные растворы для электрофоретического разделения белков в полиакриламидном геле:

1. электродный буфер: 25 мМ Трис-HCl, 250 мМ глицин, 0,1% SDS, pH = 8,3;

2. буфер для приготовления образцов (4×): 200 мМ Трис-НСl, 40% глицерин, 4% SDS, 2% 2-меркаптоэтанол, 0,01% бромфеноловый синий, рН = 6,8;
3. раствор для окрашивания геля: 30% изопропиловый спирт, 10% уксусная кислота, 0.06% кумасси G-250;
4. раствор для отмывки краски: 10% этанол, 7% уксусная кислота.

Буферный раствор ТАЕ для электрофоретического разделения нуклеиновых кислот в агарозном геле: 40 мМ Трис-ацетат, 1 мМ ЭДТА, 0,003% бромистый этидий, рН = 7,6, (для приготовления геля, к раствору добавляли 1% агарозы).

Буферный раствор Таq (10×) для ПЦР (Евроген);

Буферный раствор Т4 (10×) для проведения реакции лигирования (Fermentas);

Буферный раствор BamHI (10×) для проведения реакции рестрикции (Fermentas);

Буферные растворы для выделения ДНК из агарозного геля в составе коммерческого набора GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific): связывающий, промывочный и элюирующий растворы;

Буферные растворы для очистки фрагментов ДНК после ПЦР в составе коммерческого набора GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific): связывающий, промывочный и элюирующий растворы;

Буферные растворы для выделения плазмидной ДНК из клеток в составе коммерческого набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific): ресуспендирующий, лизирующий, нейтрализующий, промывочный и элюирующий растворы.

Буферный раствор ND96 для электрофизиологических испытаний: 82,5 мМ NaCl, 2 мМ KCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ HEPES, рН 7,5–7,6.

Раствор для электрофизиологических испытаний с повышенной концентрацией K<sup>+</sup>(НК): 2 мМ NaCl, 96 мМ KCl, 1,8 мМ CaCl<sub>2</sub>, 2 мМ MgCl<sub>2</sub> и 5 мМ HEPES, рН 7.4).

#### 2.1.4 Бактериальные штаммы

*Escherichia coli* Shuffle T7 Express (New England Biolabs);

*E. coli* XL1-Blue (Евроген);

*E. coli* DH5α (Евроген).

### 2.1.5 Клетки для экспрессии К<sup>+</sup>-каналов

Ооциты лягушки *X. laevis*.

### 2.1.6 Наборы реактивов

Коммерчески доступные наборы GeneJET Gel extraction kit, GeneJET PCR purification kit (Fermentas), GeneJET plasmid Miniprep kit, mMESSAGE mMACHINE T7 Transcription Kit (Thermo Scientific).

### 2.1.7 Программное обеспечение

База данных полипептидных последовательностей UniProt ([uniprot.org/](http://uniprot.org/)), молекулярно-графическая система PyMOL 1.7.4 (Schrödinger, США), пакет программ Lasergene для работы с нуклеотидными и аминокислотными последовательностями (DNASTAR, США), программа для контроля и записи токов pCLAMP (Axon Instruments), программа для обчета данных спектроскопии КД CONTINLL (пакет CDPro, США), программа для работы с плазмидными векторами SnapGene Viewer (GSL Biotech, США), программа для сравнения аминокислотных последовательностей Clustal Omega ([ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/](http://ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/)), программная оболочка для работы с хроматографами Breeze 2 (Waters), программное обеспечение для теоретических расчетов характеристик полипептидных молекул General Protein/Mass Analysis for Windows (GPMAW, LighthouseData, Дания), программное обеспечение для обработки результатов масс-спектрометрии Data Analysis 4.3 и Data Analysis Viewer 4.3 (Bruker Daltonics).

## 2.2 Методы

### 2.2.1 Получение плазмидных векторов для экспрессии трансгенов

#### *Полимеразная цепная реакция*

Последовательности ДНК, кодирующие токсины и их производные, конструировали из синтетических олигонуклеотидов, заказанных в компании «Евроген» (Табл. 6), методом ПЦР. Смесь объемом 50 мкл содержала 5 мкл 10× буфера для ПЦР, 1 мкл смеси дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (дНТФ, 10 мкМ каждого), 1 мкл раствора Таq-полимеразы, 39 мкл деионизованной воды и по 1 мкл растворов праймеров с концентрацией 10 мкМ.

Получение генов проводилось в два этапа. Для первого этапа была использована программа ПЦР, состоящая из 5 циклов. Каждый из циклов включал в себя 3 стадии: плавление, отжиг и амплификацию. Были выбраны следующие параметры: плавление — 95°C; отжиг — индивидуально для каждого гена, амплификация — 72°C. Последовательности всех использованных олигонуклеотидов приведены в таблице 6. Какие олигонуклеотиды для каких генов использовались, указано в таблице 7. После проверки наличия продукта ПЦР в смеси с помощью электрофореза, ее объем доводился до 500 мкл деионизованной водой. Продукт первого этапа использовался в качестве матрицы на втором этапе.

Для второго этапа использовались смеси для ПЦР объемом 50 мкл следующего состава: 5 мкл 10× буфера для ПЦР, 1 мкл раствора дНТФ, 1 мкл Таq-полимеразы, 1 мкл смеси продуктов с первого этапа, 1 мкл раствора прямого праймера (F1), 1 мкл раствора обратного праймера (R1) и 40 мкл деионизированной воды. Продукты ПЦР, кодирующие целевые пептиды, очищали с помощью коммерчески доступных наборов Fermentas.

#### *Рестрикция*

Очищенные продукты ПЦР и экспрессионный вектор рЕТ-32b (Рис. 7) подвергали гидролизу эндонуклеазами рестрикции. Реакция проводилась в смеси объемом 50 мкл, в эту смесь входили: раствор очищенных продуктов ПЦР или выделенной плазмиды объемом 30 мкл; 1 мкл раствора эндонуклеазы рестрикции BamHI и 2 мкл раствора эндонуклеазы KpnI, 5 мкл 10× буфера для рестрикции (буфер BamHI использовался для обоих ферментов), 12 мкл деионизованной воды. Реакция гидролиза эндонуклеазами происходила при 37°C в течение 3 часов. Об успешности прохождения гидролиза судили по изменению подвижности ДНК в агарозном геле. Выделение рестрицированных фрагментов велось при помощи коммерческого набора GeneJET Gel extraction kit (Fermentas).

Таблица 6. Список всех праймеров, использованных в работе. Сайты рестрикции выделены жирным, последовательность, кодирующая сайт гидролиза легкой цепи энтеропептидазы человека, выделена подчеркиванием.

Название	Последовательность (5'—3')
F1-Th6	АТА <b>GGTACC</b> GACGACGATGACAAAGCTGACAAACGTTGCTACCGTATGTG
F2-Th6	CGTTACCACGACCGTTCGTGAAAAGAAACAGTGCAAGAAAGGT
R1-Th6	ATCGAATTC <b>GGATCC</b> CTAACCGTAACGGCAACCTTTCTTGCACCTGTTC
R2-Th6	TTCACGACGGTCGTGGTAACGCTGGCACATACGGTAGCAACG
Th7-10-F1	GCGATA <b>GGTACC</b> GACGATGACGATCGTGCGCAGAAACGTTGC
Th7-10-R1	TATCGC <b>GGATCC</b> CTAGCCATAACGGCAGCCTTTCTTGCACCTG
Th7-F2	GCCAGCGTTATCATGATCGTTCGTGAGAAGAAACAGTGCAAGAAAGGCTGC
Th8/9-F2	GCCAGCGTTATCATGATCGTTCGTGAGCGTCGCCAGTGCAAGAAAGGCTGC
Th10-F2	GCCAGCGTTATCATCAGCGTTCGTGAGCGTCGCCAGTGCAAGAAAGGCTGC
Th7/8-R2	ACGATCATGATAACGCTGGCACATACGATAGCAACGTTTCTGCGCACGA
Th9-R2	ACGATCATGATAACGCTGGCACATCTGTTTGCAACGTTTCTGCGCACGA
Th10-R2	ACGCTGATGATAACGCTGGCACATCTGTTTGCAACGTTTCTGCGCACGA
Th11-F1	GCGATA <b>GGTACC</b> GACGATGACGATCGTGCGGATAAACGTTGC
Th11-R2	ACGCTGATGATAACGCTGGCACATGCGATAGCAACGTTTATCCGCACGA
F1-MeK13-3	GCGATA <b>GGTACC</b> GACGATGACGATCGTGTGGGCATTAATGTGAAATGC
F2-13-3	CAGTGCCTGAAACCGTGCAAAGATGCGGGCATGCGTTTTGGCAAATGC
R1-13-3	TATCGC <b>GGATCC</b> CTATTTTCGGGGTGCAATCGCATTTGCCATTAATGCATTT- GCCAAAACGC
R2-13-3	TGCACGGTTTTCAGGCACTGGCCGGAATGTTTGCATTTACATTAATGCCC
F2-AAAR	TGCCTGGCACCGTGCGCAGATGCGGGCATGCGTTTTGGCAAATGCATT
R1-AAAR	TATCGC <b>GGATCC</b> CTATTTTCGGGGTGCAACGGCATTTGCCATTAATGCATTT- GCCAAAACGC
R2-AAAR	CACACGGTGCCAGACACGCGCCGGAATGTTTGCATTTACATTAATGCCC
F2-RMRH	CAGTGCCTGAAACCGTGCAAAGATGCGGGCATGCGTTTTGGCAAATGC
R1-RMRH	TATCGC <b>GGATCC</b> CTATTTTCGGGGTGCAATGGCATTTACGATTCATGCATTT- GCCAAAACGC
R2-RMRH	TGCACGGTTTTCAGGCACTGACGGGAATGTTTGCATTTACATTAATGCCC
ChTx_M29I-F1	AGCTGC <b>GGTACC</b> GACGACGACGACCGTCAGTTTACCAATGTGAGCTGC
ChTx_M29I-F2	GAGCGTTTTGCCAGCGTCTGCATAACACCTCTCGCGGCAAGTGATTAATA
ChTx_M29I-R1	ACTTGAG <b>GGATCC</b> TTAAGAATAACAACGGCATTCTTATTAATACACTTGC
ChTx_M29I-R2	CGCTGGCAAACGCTCCAACATTCTTTAGACGTGGTGCAGCTCACATTGGT
Kv1.3-f	TCTCCTTCAAACCTGCTGGTGC
Kv1.3-r	GCGCTTAATGCGCCGCTAC
Kv1.3mut1-f	GAGCGAGATTCACAGTTCCCCAGCATCCCGGATGCCTTC
Kv1.3mut1-r	GAACGTGTAATCTCGCTCGTCTGCCTCGGCAAAGTAG
Kv1.3mut2-f	ACGGCGATATGGTTCCAACCTACCATAGG
Kv1.3mut2-r	GTAGTTGGAACCATATCGCCGTAACC
Kv1.3mut3-f	GACCCCGATTACAGTTCAGCAGC
Kv1.3mut3-r	CTGAACTGTGAATCGGGGTCGTCTG
T7rev	ATGCTAGTTATTGCTCAG

Таблица 7. Соответствие генов и праймеров, использованных для их синтеза.

Ген	Названия праймеров
Tk-hefu-6	F1-Th6, F2-Th6, R1-Th6, R2-Th6
Tk-hefu-7	Th7/8-R2, Th7-10-F1, Th7-10-R1, Th7-F2
Tk-hefu-8	Th7-10-F1, Th7-10-R1, Th8/9-F2, Th7/8-R2
Tk-hefu-9	Th7-10-F1, Th7-10-R1, Th8/9-F2, Th9-R2
Tk-hefu-10	Th7-10-F1, Th7-10-R1, Th10-F2, Th10-R2
Tk-hefu-11	Th7-10-R1, Th10-F2, Th11-F1, Th11-R2
MeKTx13-3	F1-MeK13-3, F2-13-3, R1-13-3, R2-13-3
MeKTx13-3_AAAR	F1-MeK13-3, F2-AAAR, R1-AAAR, R2-AAAR
MeKTx13-3_RMRH	F1-MeK13-3, F2-RMRH, R1-RMRH, R2-RMRH
MeKTx11-1	Me-1f, Me-2f, Me1-1r, Me1-2r
MeKTx11-3	Me-1f, Me-2f, Me3-1r, Me3-2r
MeKTx11-1_G9V	Me-1f, Me-2f, Me3-1r, Me1-2r
MeKTx11-1_P37S	Me-1f, Me-2f, Me1-1r, Me3-2r
ChTx_M29I	ChTx_M29I-F1, ChTx_M29I-F2, ChTx_M29I-R1, ChTx_M29I-R2
Kv1.3mut1	Kv1.3mut1-f, Kv1.3mut1-r, Kv1.3-f, Kv1.3-r
Kv1.3mut2	Kv1.3mut2-f, Kv1.3mut2-r, Kv1.3-f, Kv1.3-r
Kv1.3mut3	Kv1.3mut3-f, Kv1.3mut3-r, Kv1.3-f, Kv1.3-r

### Лигирование

Полученные рестрицированные молекулы ДНК лигировали с экспрессионным вектором рЕТ-32b. Состав смеси для лигирования: 7 мкл раствора рестрицированного вектора, 10 мкл раствора рестрицированной вставки, 2 мкл 10× буфера для лигирования, 1 мкл раствора Т4-ДНК-лигазы; общий объем смеси 20 мкл. Реакцию проводили при 16°C в течение ночи.

Лигазные смеси после инкубации очищали при помощи осаждения нуклеиновых кислот. Для этого к лигазной смеси добавляли 1 мкл гликогена, 1/10 объема 5 М NaCl и три объема этанола. Смесь выдерживали в течение часа при -70°C. После инкубации смесь центрифугировали в течение 10 минут при 13400 об/мин. После центрифугирования супернатант сливали, а к осадку добавляли 500 мкл 70% этанола, ресуспендировали и вновь центрифугировали при тех же условиях. После центрифугирования супернатант сливали, а осадок растворяли в 10 мкл деионизированной воды. Полученный раствор использовали для трансформации клеток *E. coli* XL1Blue методом электропорации. После этого, клетки инкубировали час в среде LB, а затем их высевали на чашки Петри с агаризованной средой и необходимым антибиотиком.



### *Отбор векторов*

После инкубации чашек Петри в термостате на среде появились колонии. Для определения колоний, содержащих необходимые гены, проводили ПЦР с концевыми праймерами, аналогично второму этапу синтеза гена. В качестве матрицы использовали клетки колонии. По наличию полосы на электрофореze, соответствующей необходимому гену, производили отбор клонов, содержащих данный вектор. Затем клоны выращивали в жидкой среде в присутствии антибиотика ампициллина в концентрации 100 мкг/мл при интенсивной аэрации для получения клеточных культур.

Из этих культур были выделены плазмиды при помощи набора реактивов GeneJET plasmid Miniprep kit (Thermo Scientific). Плазмиды в области вставки были секвенированы в компании «Евроген» по методу Сенгера с использованием праймера T7rev. По результатам секвенирования проводили отбор клонов, содержащих встроенный ген с правильной последовательностью. В результате были получены конструкции pET-32b-Trx-Tk-hefu7, pET-32b-Trx-Tk-hefu8, pET-32b-Trx-Tk-hefu9, pET-32b-Trx-Tk-hefu10, pET-32b-Trx-Tk-hefu11, pET-32b-Trx-MeKTx13-3, pET-32b-Trx-MeKTx13-3\_AAAR, pET-32b-Trx-MeKTx13-3\_RMRH, pET-32b-Trx-ChTx\_M29I, где Trx — ген, кодирующий тиоредоксин. После этого выделенными векторами трансформировали клетки *E. coli* Shuffle T7 Express, в которых проводили экспрессию трансгенов.

## 2.2.2 Получение рекомбинантных пептидов

### *Гетерологическая экспрессия*

Клетки *E. coli* SHuffle T7 Express трансформировали экспрессионными векторами и растили при активной аэрации и температуре 37°C в среде LB с добавлением ампициллина (100 мг/мл) до оптической плотности 0,4–0,6,  $\lambda = 600$  нм. Экспрессию рекомбинантных генов, кодирующих гибридные белки, индуцировали добавлением ИПТГ в концентрации 0,2–1 мМ. Культуры инкубировали при аэрации в течение 3 часа при 37°C или в течение ночи при 22°C.

### *Очистка гибридных белков*

Для выделения гибридных белков использовали металл-хелатную аффинную хроматографию, поскольку они содержали последовательность из шести остатков гистидина.

Клеточную биомассу ресуспендировали в 30 мл стартового буфера для аффинной хроматографии и подвергали лизису на ультразвуковом дезинтеграторе. Полученный лизат центрифугировали 15 минут при 10000 об/мин для удаления нерастворимых частиц. Смола уравновешивали стартовым буфером для аффинной хроматографии, а затем наносили супернатант и выделяли из него гибридный белок, следуя инструкции производителя: промывали и элюировали соответствующими буферными растворами.

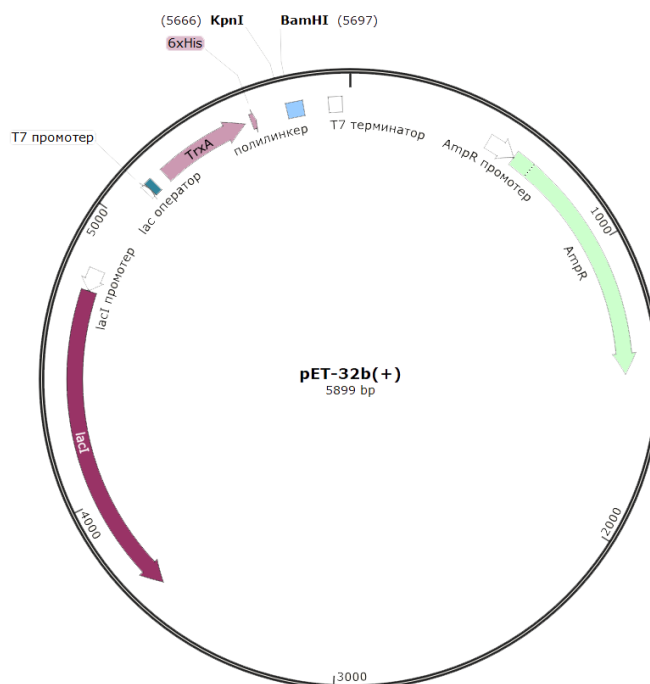


Рисунок 7. Карта плазмиды pET-32b. Содержит ген устойчивости к ампициллину (AmpR) под управлением AmpR промотера, лактозного репрессора (lacI) под управлением lacI промотера, тиоредоксина (TxA) под управлением T7 промотера и lac оператора. Показаны сайты ферментов рестрикции BamHI и KpnI, по которым происходило клонирование.

Очистку химерных белков после аффинной хроматографии проводили при помощи обратно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ). Для этого полученный элюат наносили на колонку Jupiter C<sub>5</sub> (10×250 мм), компоненты элюата смывались, а белок связывался с колонкой. После того, как гидрофильные компоненты сошли с колонки, химерные белки элюировали 80% раствором ацетонитрила. Полученные гибридные белки концентрировали на роторном испарителе и затем лиофилизировали.

### *Гидролиз гибридных белков*

Лиофилизированные гибридные белки растворяли в 50 мМ буферном растворе Трис-НСl (рН 8), конечная концентрация гибридного белка составляла 1 мг/мл. Затем добавляли легкую цепь энтеропептидазы человека в соотношении 0,4 мкг на 1 мг гибридного белка, после чего смесь инкубировали в термостате при 37°C в течение 16 часов.

### *Очистка целевых продуктов*

Очистку рекомбинантных полипептидов проводили методом ОФ-ВЭЖХ на колонке Jupiter C<sub>5</sub> (4,6×250 мм) в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (от 0 до 60% за 60 минут) в 0,1% ТФУ при скорости потока 1 мл/мин.

## 2.2.3 Изучение рекомбинантных пептидов

### *Определение концентрации пептидов*

Концентрацию пептидов определяли спектрофотометрически. Спектры оптического поглощения получали на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu). Для расчета использовали формулу:  $OD = \epsilon_{280} \times C \times l$ , где  $OD_{280}$  — оптическая плотность раствора при  $\lambda = 280$  нм,  $\epsilon_{280}$  — коэффициент молярной экстинкции пептида при  $\lambda = 280$  нм,  $C$  — концентрация пептида,  $l$  — длина оптического пути. Расчет  $\epsilon_{280}$  проводился в программе GPMW. Для пептидов, не имеющих ароматических а.о., определение концентрации производилось при  $\lambda = 214$  нм. Расчет  $\epsilon_{214}$  производился по формуле  $\epsilon_{214} = \epsilon_p \times n_p + \sum(\epsilon_a \times n_a)$ , где  $\epsilon_p$  — коэффициент поглощения пептидной связи при 214 нм,  $n_p$  — количество пептидных связей,  $\epsilon_a$  — коэффициент поглощения каждой отдельной аминокислоты при 214 нм,  $n_a$  — количество каждого из аминокислотных остатков [176].

### *Масс-спектрометрия (МС)*

Образцы анализировали методом матрично-активированной лазерной десорбции-ионизации (МАЛДИ) МС на спектрометре Ultraflex TOF-TOF (Bruker Daltonik). Измерения проводили, используя 10–100 пкмоль образца. 2,5-Дигидробензойную кислоту использовали в качестве матрицы. Измерения проводили в рефлекторном режиме, ошибка не превышала 100 р.р.м.

### Спектроскопия кругового дихроизма (КД)

Спектры КД были получены в лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН. Измерения проводились в буфере  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,5) для пептидов в концентрации 1 мг/мл на спектрополяриметре J-810 (Jasco). Спектры КД были измерены в диапазоне 190–250 нм с шагом 0,2 нм при температуре 25°C, длина оптического пути 0,01 см. Вторичная структура пептидов была проанализирована с использованием ПО CONTILL (программный пакет CDPPro), набор референсных спектров SMP56 [177].

Параметр «хорошего соответствия» NRMSD (нормализованное среднеквадратичное отклонение) является наиболее полезной единственной мерой того, насколько хорошо теоретический спектр КД, рассчитанный на основе полученного состава вторичной структуры, соответствует экспериментальным данным во всем интересующем диапазоне длин волн. NRMSD определяется как:

$$y = \left[ \frac{\sum (\theta_{exp} - \theta_{cal})^2}{\sum (\theta_{exp})^2} \right]^{1/2}$$

и находится в диапазоне от 0 (идеальное соответствие) до 1 (отсутствие соответствия). Обычно значение NRMSD выше 0,25 считают ошибкой процедуры анализа; на практике следует стремиться к значениям менее 0,1, а в идеале — 0,05 или ниже.

### Метод двухэлектродной фиксации потенциала

Данный метод был использован для тестирования рекомбинантных пептидов на панели  $\text{K}_V$ -каналов в сотрудничестве с лабораторией токсикологии и фармакологии Католического университета г. Лёвен, Бельгия. Для экспрессии различных изоформ  $\alpha$ -субъединицы  $\text{K}_V$ -каналов ( $\text{rK}_V1.1$  (pGEM-HE),  $\text{rK}_V1.2$  (pAKS),  $\text{hK}_V1.3$  (pCl-neo),  $\text{rK}_V1.4$  (pGEM-HE),  $\text{rK}_V1.5$  (pGEM-HE),  $\text{rK}_V1.6$  (pGEM-HE),  $\text{hK}_V1.3\text{mut}1$ ,  $\text{mut}2$ ,  $\text{mut}3$ ;  $\text{hK}_V2.1$  (pSGEM),  $\text{hK}_V3.1$  (pSGEM),  $\text{rK}_V4.2$  (pBK) и  $\text{hK}_V11.1$  (pSP64)),  $\text{Na}_V$ -каналы ( $\text{rNa}_V1.1$  (pLCT1),  $\text{rNa}_V1.2$  (pLCT1),  $\text{rNa}_V1.4$  (pUI2),  $\text{hNa}_V1.5$  (pcDNA3.1) и  $\text{BgNa}_V1$  (pGH19)), и  $\text{rCa}_V3.3$  (pGEM-HE) в ооцитах *X. laevis* соответствующие гены были клонированы в составе плазмид. Далее плазмиды линеаризовали по сайтам рестрикции PstI ( $\text{K}_V1.1$ ), SphI ( $\text{K}_V1.2$ ), NotI ( $\text{K}_V1.3$ , 1.4, 2.1,  $\text{Na}_V1.1$ , 1.2, 1.4), SalI ( $\text{K}_V1.5$ ), NdeI ( $\text{K}_V1.6$ ), XbaI ( $\text{K}_V3.1$ , 4.2), EcoRI ( $\text{K}_V11.1$ ,  $\text{rCa}_V3.3$ ). Кэпированные мРНК синтезировались с помощью системы для транскрипции mMACHINE T7 и SP6. 50 нл раствора РНК, кодирующей  $\alpha$ -субъединицы  $\text{K}_V$ -каналов, с концентрацией 1

нг/нл вводили в ооциты с помощью микроинжектора Nanoject II, после чего клетки инкубировали 2–4 дня в растворе ND96, содержащем 50 мг/л сульфата гентамицина.

Эксперименты по установлению биологической активности соединений на ооцитах, экспрессирующих каналы  $K_v1.1$ – $1.6$ ,  $K_v1.3mut1$ ,  $mut2$ ,  $mut3$ ;  $2.1$ ,  $3.1$ ,  $4.2$  и  $11.1$ ,  $Nav1.1$ ,  $1.2$ ,  $1.4$ ,  $1.5$  и  $BgNav1$ , а также  $Ca_v3.3$ , проводились на электрофизиологической установке Geneclamp 500B, запись токов велась при помощи инструментария Digidata 1200 и pCLAMP (Axon Instruments). Для уточнения видовой специфичности ионных каналов используются следующие обозначения: r — крыса *Rattus norvegicus* (например, rKv1.1); h — человек *Homo sapiens* (например, hKv1.3). Измерения проводились при комнатной температуре (18 – 22°C), стеклянные электроды были заполнены 3 М раствором KCl и имели сопротивление 0.7 – 2 МОм.

Токи регистрировались на частоте 2 кГц и фильтровались на частоте 0,5 кГц с использованием четырехпольного фильтра нижних частот Бесселя. Потенциал покоя был установлен на уровне –90 мВ. Вычитание тока утечки выполняли с использованием протокола –P/4. Токи через  $K_v$ -каналы вызывались деполяризацией до 0 мВ в течение 500 мс, за которой следовал импульс до –50 мВ в течение 500 мс. Для исследования зависимости проводимости от напряжения токи вызывали с шагом 5 мВ. Проводимость  $K_v$ -каналов рассчитывали по закону Ома:

$$g_K = \frac{I_K}{V_m - V_{rev}},$$

где  $I_K$  — максимальный ток при потенциале  $V_m$ ,  $V_{rev}$  — потенциал реверсии. Данные зависимости проводимости от напряжения были определены с использованием уравнения Больцмана:

$$\frac{g_K}{g_{max}} = \left[ 1 + e^{\frac{V_{1/2} - V_m}{k}} \right]^{-1},$$

где  $g_{max}$  — максимальное значение  $g_K$ ,  $V_{1/2}$  — напряжение, соответствующее полумаксимальной проводимости, а  $k$  — коэффициент наклона. Различные концентрации пептидов, разведенных в ND96, использовали для измерения ингибирования тока в зависимости от нее. Эти растворы добавляли в емкость с ооцитом и сразу же смешивали, получая таким образом желаемые конечные концентрации. Затем регистрировали токи через  $K_v$ -каналы в присутствии тестируемого пептида, данные анализировали по уравнению Хилла:

$$y = \frac{100}{1 + \left( \frac{\text{ИК}_{50}}{[\text{пептид}]}\right)^h},$$

где  $y$  — амплитуда индуцированного пептидом эффекта в процентах (т.е. процент максимального ингибирования для данного соединения),  $[\text{пептид}]$  — концентрация пептида,  $\text{ИК}_{50}$  — полумаксимальная концентрация ингибирования,  $h$  — коэффициент Хилла. Все данные были получены как минимум в трех независимых повторах ( $n \geq 3$ ) с использованием разных партий ооцитов *X. laevis*. Статистическую значимость определяли с использованием однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Даннетта. Экспериментальные значения представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

Для пептидов, у которых эффект ингибирования не достигал 100%, использовалось следующее уравнение:

$$y = \frac{100}{1 + \left( \frac{\text{ЭК}_{50}}{[\text{пептид}]}\right)^h},$$

где  $y$  — амплитуда индуцированного пептидом эффекта в процентах (т.е. процент максимального ингибирования для данного соединения),  $[\text{пептид}]$  — концентрация пептида,  $\text{ЭК}_{50}$  — полумаксимальная эффективная концентрация,  $h$  — коэффициент Хилла. Все данные были получены как минимум в трех независимых повторах ( $n \geq 3$ ) с использованием разных партий ооцитов *X. laevis*. Статистическую значимость определяли с использованием однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Даннетта. Экспериментальные значения представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

### *Исследование антимикробной активности*

Определение антимикробной активности было произведено по следующему протоколу [178]. Бактерии [*Enterococcus faecalis* (Andrewes and Horder) Schleifer и Kilpper-Balz (ATCC 29212), *Escherichia coli* (Migula) Castellani и Chalmers (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula (ATCC 27853) и *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC 29213)] культивировали в течение ночи в среде LB при 37 °C. Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) для пептида производили используя двукратное разведение в 96-луночных стерильных планшетах с конечным объемом 100 мкл. Культуры клеток, достигшие середины лог-фазы, разводили средой LB до конечной

концентрации  $10^5$  колониеобразующих единиц/мл. Лиофилизированный пептид был растворен в 10 мкл воды и добавлен к 90 мкл бактериальной суспензии. Планшеты инкубировали в течение 24 часов при 37 °С. Ингибирование роста клеток определялось по поглощению при длине волны 620 нм. МИК являлась самая низкая концентрация пептида, которая вызывала 100% ингибирование роста клеток.

### *Исследование цитолитической активности*

Капиллярная кровь человека собирали в пробирки с гепарином (10 единиц/мл), разводили до  $10^7$  клеток/мл средой RPMI-1640 (ПанЭко), которая содержала 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone, США) и инкубировали с пептидом (диапазон концентраций 0.06–20 мкМ) в течение трех часов при 37 °С. Высвобождение гемоглобина измеряли как описано в [179].

Клетки легочной аденокарциномы человека A549 культивировали в ДМЕМ с добавлением 2 мМ L-глутамин и 10% фетальной бычьей сыворотки при 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Клетки пассировали дважды в неделю. Для изучения цитолитической активности пептидов, клетки пересаживали в 96-луночные планшеты (плотность  $5 \times 10^3$  клеток на лунку) за день до эксперимента. Пептиды добавляли к клеткам, конечная концентрация составила 2,5–20 мкМ. Цитотоксичность оценивалась после инкубации клеток с пептидами в течение трех часов при 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Выживаемость клеток оценивали путем окраски ядра клеток Hoechst 33342 (окрашивает все клетки) и пропидиум йодидом (окрашивает мертвые клетки). После окраски оценку выживаемости оценивали на инвертированном флуоресцентном микроскопе Axio Observer (Zeiss) [180]. Количество независимых экспериментов составляет  $n > 3$ .

### 2.2.4 Молекулярное моделирование

Компьютерное моделирование было выполнено В.М. Табакмахером в лаборатории моделирования биомолекулярных систем и группе анализа структуры мембранных белков *in silico* ИБХ РАН в тесном взаимодействии с нами.

### *Гомологичное моделирование*

Гомологичное моделирование токсинов было проведено при помощи программы MODELLER 8.2 [181]. Пространственные модели MeKTx11-1, MeKTx11-3, MeKTx11-

1\_G9V и MeKTx11-1\_P37S были построены на основе сходства их аминокислотных последовательностей с ChTx, пространственная структура которого известна (PDB ID: 2CRD). Для моделирования производных MeKTx13-3 была использована пространственная структура токсина VmKTX (PDB ID: 1BKT). Пространственные структуры производных Tk-hefu-2 были получены при помощи *in silico* мутагенеза в программе PyMOL на основе структуры Tk-hefu, определенной методом ЯМР (PDB ID: 5LM0).

Экспериментально определенная структура (атомные координаты) химерного канала крысы Kv1.2/2.1 (PDB ID: 4JTA) была использована для построения гомологичных моделей каналов Kv1.1, 1.3 и 1.6 с использованием программы MODELLER. Комплексы токсинов с химерным каналом Kv1.2/2.1 были смоделированы на основе кристаллической структуры химерного канала Kv1.2/2.1 в комплексе с ChTx (PDB ID: 4JTA). Затем производили пространственное выравнивание моделей целевых токсинов с ChTx, после которого ChTx удаляли из получившихся комплексов токсинов с химерным каналом Kv1.2/2.1. Для получения моделей комплексов токсинов с каналами Kv1.1, 1.3 и 1.6 аминокислотную последовательность химерного канала Kv1.2/2.1 заменяли на нужную в программе MODELLER.

### *Молекулярная динамика (МД)*

Подготовку комплексов токсинов с каналами к моделированию МД мы проводили в сотрудничестве с лабораторией моделирования биомолекулярных систем с использованием оригинального программного пакета IMPULSE (Крылов и др., готовится к печати). Комплекс помещали внутрь липидного бислоя, имитирующего мембрану нейронов. Был использован предварительно уравновешенный фрагмент бислоя ( $7.0 \times 7.0 \times 13.5$  нм<sup>3</sup>; 1-пальмитил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин/1-пальмитил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтанолламин/холестерин, POPC:POPE:Chl; 100:50:50 молекул, соответственно, сольватированных 14172 молекулами воды); некоторые молекулы фосфолипидов и Chl были удалены, чтобы освободить место для белка. Для сольватации использовали модель воды TIP3P [182] и ионы Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> в количестве, необходимом для поддержания электронейтральности.

Молекулярная система была уравновешена (нагрета до 37 °C) в течение 100 пс МД. Положения C<sup>α</sup>-атомов остатков канала, не формирующих вестибюль его поры, а также N<sup>ε</sup>-атом ключевого остатка лизина в токсинах фиксировали во время уравновешивания для



предотвращения дестабилизации исходного комплекса. Затем рассчитывали МД длительностью 500 нс. Все эксперименты МД были выполнены с помощью программного обеспечения GROMACS [183], с использованием набора параметров AMBER99SB-ILDN [184]. Моделирование проводили с временным шагом 2 фс, с использованием трехмерных периодических граничных условий, в изотермическом-изобарическом (NPT) ансамбле с полуизотропным давлением 1 бар и при температуре 37°C. Использовали алгоритмы баростата Берендсена [185] и термостата V-rescale [186]. Ван-дер-ваальсовы взаимодействия рассчитывали с применением сферической функции обрезания потенциала с отсечкой 1,4 нм. Электростатические взаимодействия учитывали с помощью алгоритма PME.

Анализ межмолекулярных контактов в ходе МД выполняли с использованием программного пакета IMPULSE. Водородные связи оценивали с использованием параметров утилиты hbond пакета GROMACS [183] (расстояние D–A  $\leq 0,35$  нм и угол D–H–A  $\geq 150^\circ$  для водородной связи D–H $\cdots$ A, где D и A — донор и акцептор водородной связи, соответственно); солевые мостики,  $\pi$ -катионные и стэкинг-взаимодействия, а также гидрофобные контакты рассчитывали, как описано в работах [187, 188]. Визуализация трехмерных структур белковых комплексов была выполнена с помощью программы PyMOL. Оценку энергии межмолекулярных невалентных взаимодействий осуществляли с использованием силового поля AMBER99SB-ILDN [184] с отсечкой по расстоянию 1,4 нм. Графики профилей энергии взаимодействия строили с помощью стандартных библиотек Python и пакета NumPy.

Стабильность изучаемых молекулярных систем определяли как на основе изменения среднеквадратичного отклонения (RMSD) во время симуляции МД, так и на сравнении образующихся специфичных межмолекулярных контактов в течение первых 110 нс и последующих 400 нс симуляции МД. Подвижность пептидов в растворе и в комплексе с каналом определяли путем вычисления значений RMSD и среднеквадратичной флуктуации. Для этого МД отдельных пептидов была рассчитана в водном окружении в течение 110 нс.

### *Докинг*

Индивидуальный белок-белковый докинг «ансамбля» содержал следующие этапы:

1. Репрезентативные конформационные ансамбли Kv1.3 (27 структур), ChTx, Tk-hefu-2 и Tk-hefu-10 (11 структур для каждого пептида) были созданы из траекторий МД с использованием утилиты кластеризации gmx программного обеспечения GROMACS с алгоритмом кластеризации Gromos и расстоянием отсечки 0,15 нм.

2. Для каждой из трех систем: ChTx–Kv1.3, Tk-hefu-2–Kv1.3 и Tk-hefu-10–Kv1.3 проведено  $27 \times 11 = 297$  сеансов белок-белкового докинга. Докинг производился с помощью программы ZDOCK (версия 3.0.2). На этом этапе мы ограничили поверхность стыковки Kv1.3 внешним вестибюлем поры. Для каждого комплекса ZDOCK генерировал 2000 структур. Для дальнейшего анализа было использовано 100 решений с наивысшими баллами (по 29700 решений для каждой из трех молекулярных систем).

3. Отобранные результаты стыковки были дополнительно отфильтрованы с использованием протокола повторной оценки для получения нескольких десятков лучших решений. Использовались следующие критерии: а) токсин имеет значительную площадь контакта с рецептором ( $>450 \text{ \AA}^2$  для ChTx,  $>400 \text{ \AA}^2$  для Tk-hefu-2 и  $>475 \text{ \AA}^2$  для Tk-hefu-10); б) значительное количество специфических контактов (водородные связи, ионные мостики и стэкинг-взаимодействия;  $\geq 12$  для ChTx,  $\geq 9$  для Tk-hefu-2 и  $\geq 10$  для Tk-hefu-10), в) необходимая комплементарность гидрофобные/гидрофильные свойства комплекса ( $>0,6$  для ChTx,  $>0,7$  для Tk-hefu-2 и  $>0,75$  для Tk-hefu-10) и г) ключевой остаток лизина образует по крайней мере одну водородную связь или солевой мостик. Анализ этих свойств в комплексах проводили с помощью программы PLATINUM. Таким образом, для молекулярных комплексов ChTx–Kv1.3, Tk-hefu-2–Kv1.3 и Tk-hefu-10–Kv1.3 получены 79, 87 и 95 лучших докинг-решений соответственно. Докинг Tk-hefu-2–Kv1.3 не привела к решению или группе решений, которые можно было бы однозначно трактовать как корректную модель комплекса. Только два решения имеют тенденцию «затенять» (но не закупоривать) поры канала с помощью ключевой боковой цепи лизина (K22), тогда как известно, что эти пептиды физически закупоривают поры. Только 12 из лучших решений для докинга Tk-hefu-10 имеют положение ключевой боковой цепи лизина, близкое к закупорке поры в модели, созданной вручную. Среди лучших решений докинга ChTx только 14 перекрываются по положению ключевого лизина (K27), а около 10 близки к таковому в модели, созданной вручную. С одной стороны, эти результаты демонстрируют, что количество решений докинга с ключевой боковой цепью лизина, закупоривающей поры канала, увеличивается вместе с комплексным средством.

### 3. Результаты

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, часть из которых действует на  $K_v$ -каналы. Последовательной очисткой с использованием методов хроматографии можно добиться получения токсинов в индивидуальном состоянии, которые затем можно исследовать различными методами, в частности методами 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 различные методы предсказания аминокислотных замен для придания таким каркасам искомых свойств. В соответствии с вышесказанным, в структуре главы будут выделены три раздела. Первый раздел посвящен изучению соединений, выделенных из природного источника, а именно объяснению их селективности методами компьютерного моделирования. Второй раздел посвящен производным токсинов, у которых направленно изменяли селективность, третий — созданию активных соединений на основе инертного каркаса.

#### 3.1 Изучение токсинов из яда скорпиона *Mesobuthus eupeus*

##### 3.1.1 Получение и характеристика токсинов MeKTx11-1 и 3

###### *Очистка MeKTx11-1 и 3 и получение рекомбинантных пептидов*

Природные MeKTx11-1 и 3 были очищены из цельного яда скорпиона *Mesobuthus eupeus* с использованием многостадийной хроматографии, как описано ранее [60]. В свою очередь, рекомбинантные MeKTx11-1, 3 и их производные с единичными заменами MeKTx11-1\_G9V и MeKTx11-1\_P37S (Рис. 8) были получены в прокариотической системе экспрессии и предоставлены О.В. Некрасовой (лаборатория инженерии белка ИБХ РАН). Конечный выход рекомбинантных пептидов составил 10–12 мг на 1 л бактериальной культуры.

	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>	C	M	N	K	K	C	R	C	Y	S

Рисунок 8. 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 канала, выделен жирным шрифтом. Z обозначает остаток пироглутаминовой кислоты. Нумерация а.о. приведена над последовательностями.

### Электрофизиология

Активность природных и рекомбинантных токсинов тестировали в концентрации 1 мкМ на панели каналов  $K_V$  (rK<sub>V</sub>1.1, rK<sub>V</sub>1.2, hK<sub>V</sub>1.3, rK<sub>V</sub>1.4, rK<sub>V</sub>1.5, rK<sub>V</sub>1.6, hK<sub>V</sub>2.1, hK<sub>V</sub>3.1, rK<sub>V</sub>4.2 и hK<sub>V</sub>11.1), Nav (rNav1.1, rNav1.2, rNav1.4, hNav1.5 и BgNav1), и Cav3.3, экспрессированных в ооцитах *X. laevis*. Было обнаружено, что природные MeKTx11-1 и 3 активны на нескольких изоформах, принадлежащих к подсемейству Shaker: K<sub>V</sub>1.1–1.3 и K<sub>V</sub>1.6, в то время как на K<sub>V</sub>1.4, K<sub>V</sub>1.5, K<sub>V</sub>2.1, K<sub>V</sub>3.1, K<sub>V</sub>4.2, hERG, Nav1.1, Nav1.2, Nav1.4, Nav1.5, BgNav1 или Cav3.3 активности не наблюдалось. Оба токсина в концентрации 1 мкМ полностью ингибировали токи через каналы K<sub>V</sub>1.2 и 1.3, в то время как полное блокирование K<sub>V</sub>1.1 было обнаружено только для MeKTx11-3. MeKTx11-1 и 3 в концентрации 1 мкМ блокировали ток через канал K<sub>V</sub>1.6 на 15,8% и 49,3% соответственно. Для оценки зависимости ингибирования, вызванного токсином, от концентрации были построены кривые доза-ответ (Рис. 9). Значения ИК<sub>50</sub> для MeKTx11-1 и 3 представлены в таблице 8. Ингибирование каналов K<sub>V</sub>1.2 посредством MeKTx11-1 не зависело от напряжения, поскольку не наблюдалось различий в степени индуцированного MeKTx11-1 блока в диапазоне тестовых потенциалов от –30 мВ до +40 мВ. Чтобы выяснить, является ли MeKTx11-1 поровым блокатором или модулятором чувствительности каналов к изменению потенциала, были проанализированы вольт-амперные характеристики для K<sub>V</sub>1.2 в контроле и в присутствии токсина в растворах ND96 и НК (Рис. 10).

Таблица 8. Значения  $IC_{50}$ , рассчитанные для токсинов MeKTx11-1 и 3 и их производных по отношению к интактным и мутантным каналам. Значения  $IC_{50}$  для природных и рекомбинантных MeKTx11-1 и 3 одинаковы.

Пептид	$IC_{50}$ , нМ						
	$K_v1.1$	$K_v1.2$	$K_v1.3$	$K_v1.3mut1$	$K_v1.3mut2$	$K_v1.3mut3$	$K_v1.6$
MeKTx11-1	2110 ± 150	0,19 ± 0,01	67 ± 5	5,1 ± 0,8	0,3 ± 0,1	7,9 ± 0,9	8900 ± 900
MeKTx11-3	130 ± 10	3,1 ± 0,2	78 ± 11	28,5 ± 5,3	12,2 ± 4,2	75,3 ± 6,1	910 ± 110
MeKTx11-1_G9V	1380 ± 60	0,07 ± 0,01	1,4 ± 0,2	13,0 ± 1,2	0,5 ± 0,1	3,1 ± 0,1	6900 ± 900
MeKTx11-1_P37S	740 ± 80	0,09 ± 0,01	13,6 ± 1,1	17,8 ± 0,9	0,7 ± 0,1	24,4 ± 1,8	6000 ± 900

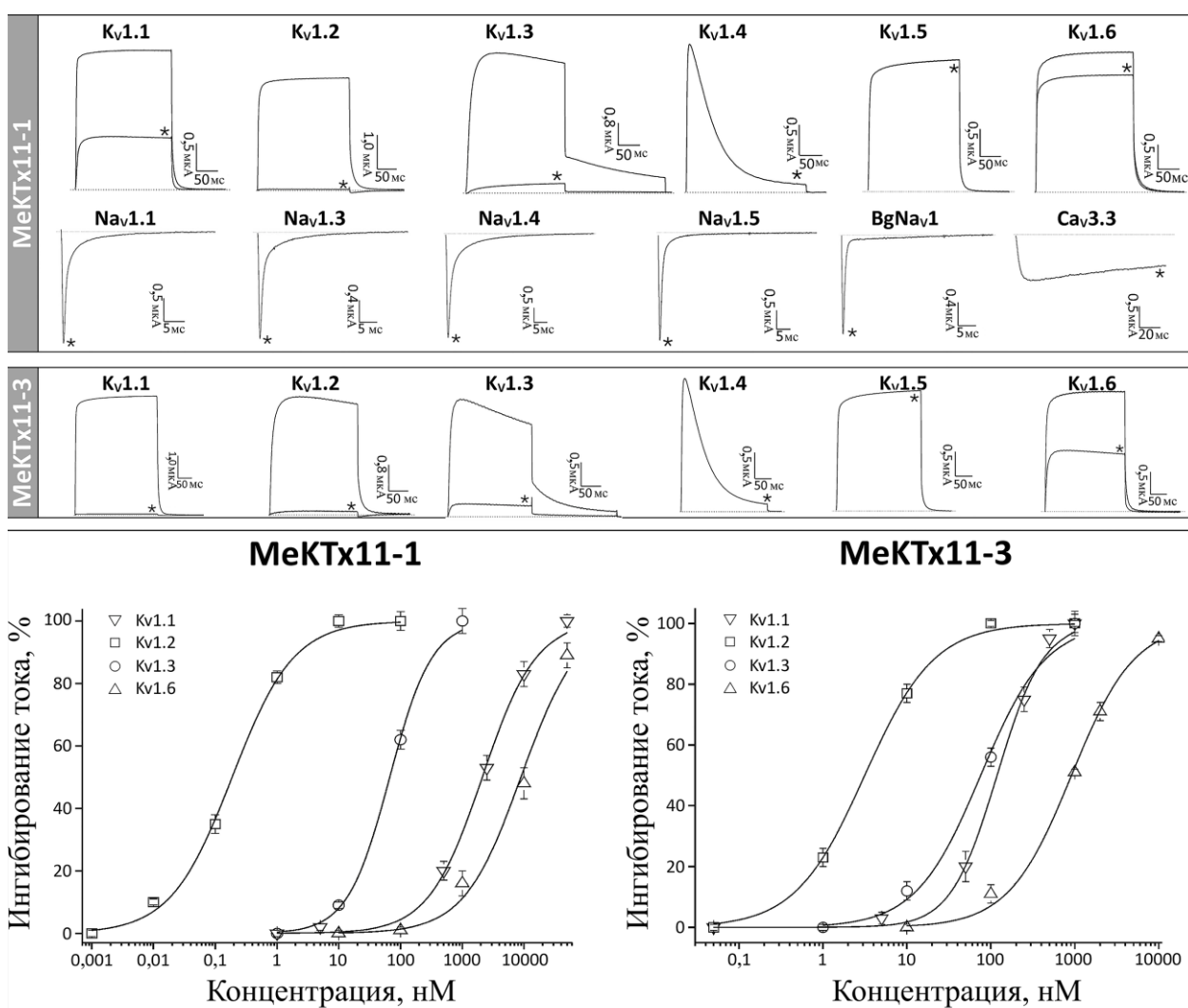


Рисунок 9. Активность MeKTx11-1 и 3 по отношению к различным каналам. Представлены записи токов через каналы  $K_v1.1-1.6$ , Nav и Cav в контроле и после аппликации 1 мкМ токсина (обозначены звездочками). Кривые зависимости блока тока через каналы от концентрации показаны ниже. Значения  $IC_{50}$  приведены в таблице 8.

В концентрации 200 пМ токсин MeKTx11-1 вызывал ингибирование тока на  $53 \pm 2\%$  и  $59 \pm 3\%$  в растворах ND96 и НК соответственно ( $n = 5$ ). В ND96 вольт-амперная

характеристика в контроле и в присутствии 200 пМ токсина характеризовались значением  $V_{1/2}$ , равным  $-5 \pm 1$  и  $-8 \pm 1$  мВ соответственно ( $n = 5$ ). Кроме того, вольт-амперная характеристика в растворе НК показала, что MeКТх11-1 существенно не влиял на потенциал реверсии  $E_K$  ( $P > 0,05$ ,  $n = 5$ ). Значения  $E_K$  составили  $-5 \pm 2$  мВ в контроле и  $-7 \pm 1$  мВ после аппликации токсина. В целом, эти эксперименты говорят о том, что ингибирование тока при связывании MeКТх11-1 идет по пути его взаимодействия с порой канала. Активность рекомбинантных токсинов MeКТх11-1 и 3 были идентичны природным токсинам. Активность MeКТх11-1\_G9V и MeКТх11-1\_P37S тестировали на каналах  $K_v1.1-1.3$  и 1.6, так как оригинальные токсины не проявляли активности на других каналах. Аналогично MeКТх11-1 и 3, мутанты были активны в отношении изоформ  $K_v1.1-1.3$  и 1.6; значения  $IC_{50}$  представлены в таблице 8.

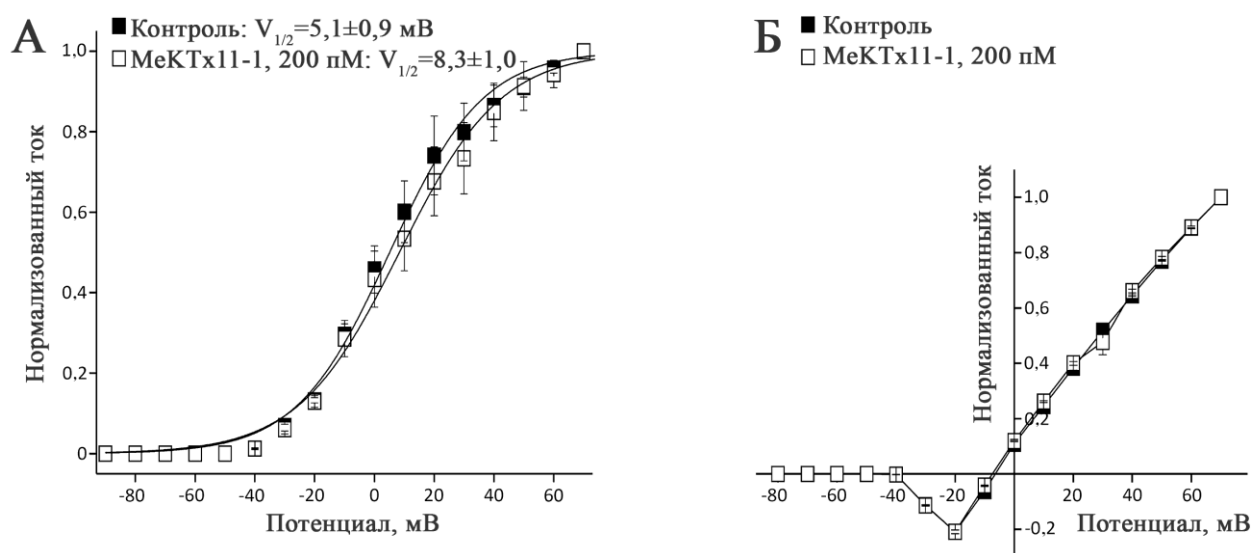


Рисунок 10. Вольт-амперные характеристики канала  $K_v1.2$ . Токи измеряли в растворах ND96 (А) и НК (Б). Черные квадраты, контроль; белые квадраты — в присутствии 200 пМ MeКТх11-1.

### Молекулярное моделирование

Пространственная структура MeКТх11-1 и 3 (а также MeКТх11-1\_G9V и MeКТх11-1\_P37S) неизвестна. Однако их сходство с ChТх из *L. quinquestriatus hebraeus* (58–60% идентичных остатков, Рис. 8), а также принадлежность к одному и тому же подсемейству  $\alpha$ -КТх1 позволяют нам использовать ChТх для построения надежных моделей. На основе известной структуры химерного канала  $K_v1.2/2.1$  была сгенерирована модель  $K_v1.3$  по

гомологии. Комплексы MeKTx11-1, MeKTx11-3, MeKTx11-1\_G9V и MeKTx11-1\_P37S с Kv1.2 и 1.3 моделировались на основе сходства с ChTx в комплексе с химерным каналом Kv1.2/2.1 [30]. Затем все комплексы токсинов с каналами были помещены в смоделированный фрагмент мембраны (POPC/POPE/Chl, 2:1:1), разработанный для имитации мембран нейронов. После этого системы подвергали МД. На рисунке 11 изображен комплекс MeKTx11-1—Kv1.2 в мембранном окружении.

На рисунках 12–14 показаны модели комплексов между MeKTx11-1 или 3 и Kv1.3 или Kv1.2 после МД. 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 у Kv1.3. А именно, основная цепь R24 и боковая цепь N25 образуют водородные связи с боковой цепью Q353 в Kv1.2 (Рис. 12Б). В комплексе с Kv1.3 G380 занимает то же положение, что и Q353 в канале Kv1.2 (Рис. 12А), 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, но не 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. 13).

У MeKTx11-1 остаток K18 образует солевой мостик и водородную связь с остатком D351 канала Kv1.2. Соответствующий остаток T378 в структуре Kv1.3 не образует контакта с K18 (Рис. 12Б), что связано с отличающейся конформацией петли S5-P в комплексе токсина с каналом. Эти расчетные данные показывают, что токсины образуют более слабые комплексы с Kv1.3.

Согласно анализу комплекса ChTx с химерным каналом Kv1.2/2.1, ароматическое кольцо Y36 токсина взаимодействует с остатком D375 канала [30]. Анализ траекторий МД показал, что Y36 в MeKTx11-1 и MeKTx11-1\_G9V образует среднеживущую водородную связь с D375 канала Kv1.2 (Рис. 14). С другой стороны, С-концевой остаток S37 образует среднеживущую внутримолекулярную водородную связь с N-концевым остатком пироглутаминовой кислоты в MeKTx11-3 и MeKTx11-1\_P37S, которая отсутствует в MeKTx11-1 и MeKTx11-1\_G9V (Рис. 14).

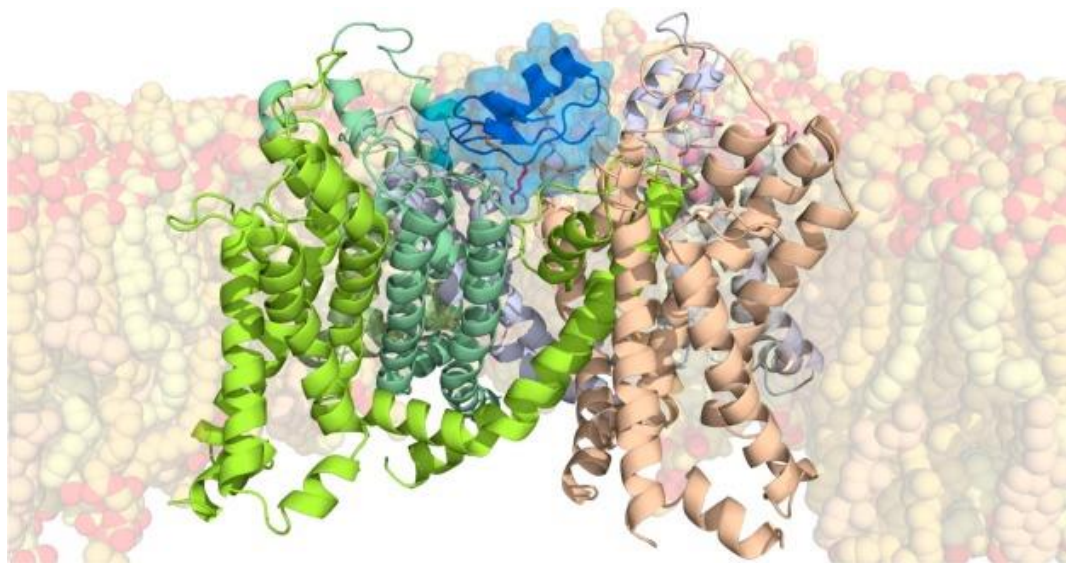


Рисунок 11. Модель комплекса MeKTx11-1—Kv1.2. Канал находится в бислое POPC/POPE/Chl (2:1:1), изображение получено через 220 нс симуляции МД. Гидрофобные атомы POPC, POPE и Chl показаны полупрозрачными и окрашены в песочно-желтый, светло-желтый и бежевый цвета соответственно; атомы кислорода фосфолипидов окрашены в красный цвет. MeKTx11-1 представлен в виде синей ленточной структуры и синей полупрозрачной молекулярной поверхности. Ключевой остаток лизина (K27), входящий в пору канала, показан красной стержневой структурой. Трансмембранные сегменты Kv1.2 изображены в виде спиралей и окрашены по субъединицам: бледно-зеленый, светло-бежевый, бледно-голубой (на переднем плане) и бледно-фиолетовый (на заднем плане). Вода, ионы и часть липидов удалены для большей ясности.

Мы предполагаем, что такая водородная связь снижает подвижность С-конца токсина, препятствуя образованию дополнительных межмолекулярных контактов предшествующим остатком Y36. Таким образом, наши расчетные данные показывают, что MeKTx11-1 формирует больше специфических контактов с Kv1.2 по сравнению с MeKTx11-3.



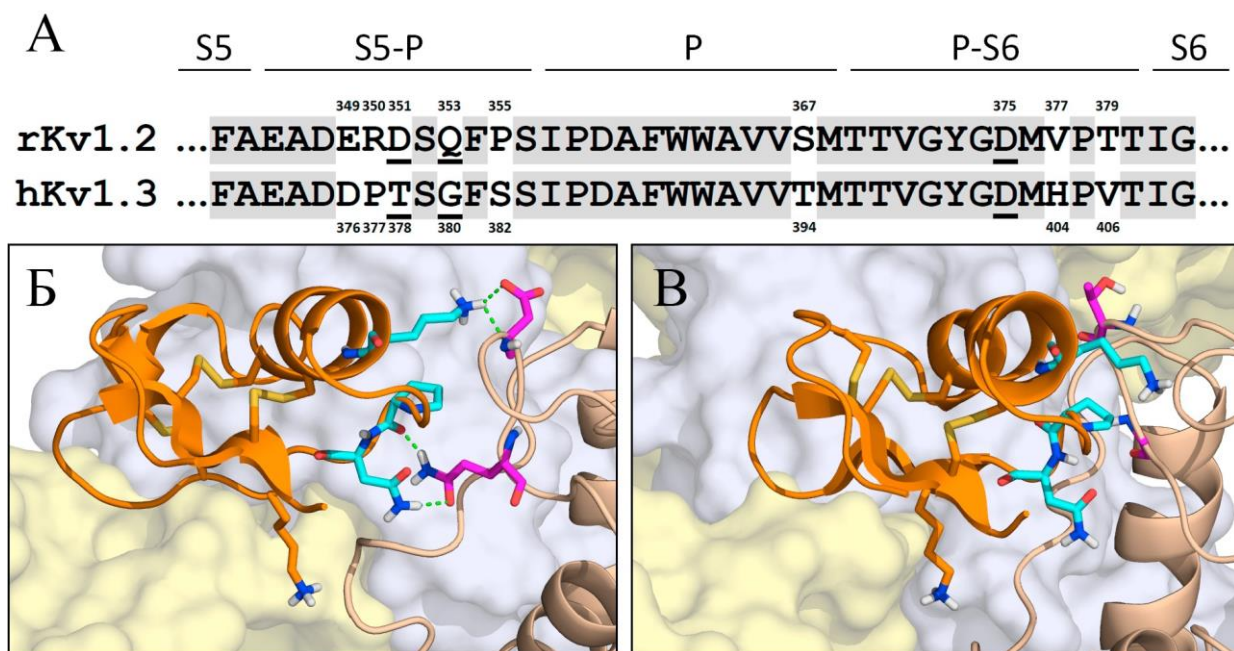


Рисунок 12. (А) Сравнение аминокислотных последовательностей поровой области rKv1.2 и hKv1.3. А.о., общие для каналов, выделены серым фоном; подчеркнуты а.о., по-разному взаимодействующие с токсинами. Нумерация а.о. приведена сверху и снизу сравнения для rKv1.2 и hKv1.3 соответственно. (Б, В) Структура моделей комплексов MeKTx11-1—rKv1.2 и MeKTx11-1—hKv1.3 после 100 нс МД (вид сбоку). Токсин показан в виде ленточной структуры (оранжевого цвета); дисульфидные мостики (желтые) и ключевого остатка лизина (K27) показаны в виде стержневой модели. Для наглядности субъединица канала на переднем плане скрыта, а две субъединицы на заднем плане показаны в виде молекулярной поверхности, окрашенной в серебристый и светло-желтый цвета. Субъединица, образующая множество различных взаимодействий с токсином, показана бежевой ленточной структурой. А.о. токсина и канала, участвующие в специфических межмолекулярных контактах в комплексе MeKTx11-1—rKv1.2, и соответствующие а.о. в MeKTx11-1—hKv1.3 показаны в виде стержневой модели (голубым и розовым соответственно). Зелеными пунктирными линиями показаны специфические контакты (водородные связи и солевой мостик).

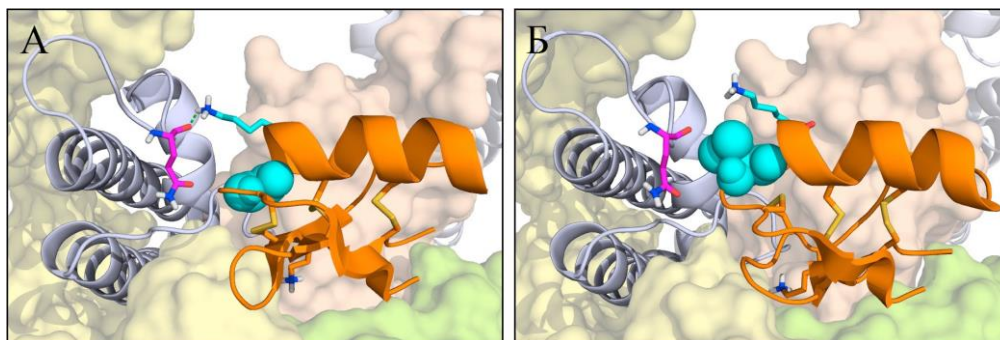


Рисунок 13. Модель комплексов  $gKv1.2$  с MeKTx11-1 (А) и MeKTx11-3 (Б) после 100 нс МД. Токсины показаны в виде ленточной структуры оранжевого цвета; дисульфидные мостики (желтые) и ключевой остаток лизина (K27) показаны в виде стержневой модели. Для наглядности три субъединицы канала на заднем плане показаны как молекулярная поверхность, окрашенная в светло-желтый, светло-зеленый и бежевый цвета. Субъединица, образующая различающиеся взаимодействия с токсинами, показана серебристой ленточной структурой. Остаток K11 токсинов и Q353 канала, вовлеченные в специфические межмолекулярные контакты в комплексе MeKTx11-1— $gKv1.2$ , и соответствующие им а.о. в MeKTx11-3— $gKv1.2$  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 специфический контакт (водородную связь).

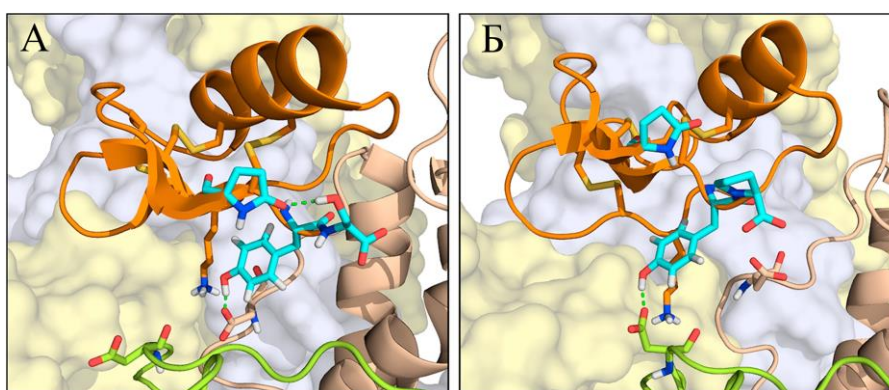


Рисунок 14. Модели комплексов  $gKv1.2$  с токсинами после 100 нс МД (вид сбоку). Обозначения аналогичны рисунку 12. Субъединицы, образующие множество различных взаимодействий с токсином, показаны зеленой и бежевой ленточными структурами. (А) У MeKTx11-3 остаток Y36 образует водородную связь с D375 канала  $Kv1.2$ . (Б) У MeKTx11-1 остаток Y36 имеет тенденцию к образованию дополнительной водородной связи с D375 канала  $Kv1.2$  соседней субъединицы (показана водородная связь только с соседней субъединицей).

### Взаимодействие токсинов с мутантным Kv1.3

Для экспериментальной проверки предсказанных контактов токсина с Kv1.2, ответственных за селективность по отношению к нему, были сконструированы и получены три мутанта Kv1.3 (Рис. 15). В Kv1.3mut1 мы заменили а.о., расположенные в петле S5–P, на соответствующие а.о. из Kv1.2:  $^{376}\text{DPTSGFSS}^{382} \rightarrow ^{376}\text{ERDSQFP}^{382}$ . В Kv1.3mut2 в петлю P–S6 были введены две замены:  $^{404}\text{HPV}^{406} \rightarrow ^{404}\text{VPT}^{406}$ . И, наконец, Kv1.3mut3 характеризуется двумя точечными мутациями в S5–P:  $^{378}\text{TSG}^{380} \rightarrow ^{378}\text{DSQ}^{380}$ .

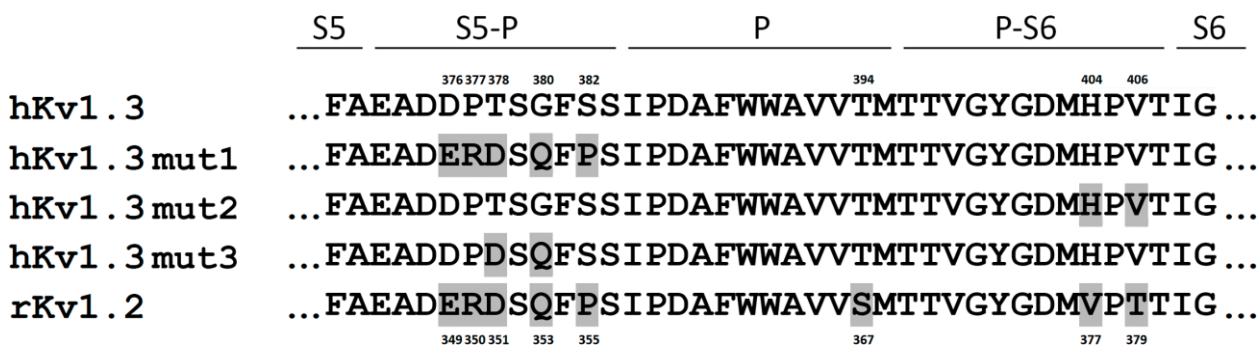


Рисунок 15. Выравнивание аминокислотной последовательности области вестибуля поры hKv1.3, rKv1.2 и мутантных каналов Kv1.3mut1–3. А.о., отличающиеся от а.о. Kv1.3, выделены серым фоном. Нумерация а.о. находится сверху и внизу выравнивания для hKv1.3 и rKv1.2 соответственно.

MeKTx11-1, 3 и их производные тестировали против этих мутантных каналов, экспрессируемых в ооцитах *X. laevis*; значения ИК<sub>50</sub> приведены в таблице 8. Все пептиды проявляли повышенную активность в отношении Kv1.3mut2 по сравнению с Kv1.3, а MeKTx11-1 также был значительно более активен в отношении Kv1.3mut1 и Kv1.3mut3, что подтверждает наши предположения о том, что пептиды взаимодействуют со специфичными для Kv1.2 а.о. в петлях S5–P и P–S6.

Селективность токсина по отношению к конкретной изоформе канала (в нашем случае Kv1.2) можно оценить, используя коэффициент селективности: отношение значений ИК<sub>50</sub> (или K<sub>d</sub>) для двух каналов. По этому параметру среди известных токсинов есть три лидера: MeKTx11-1 (описан в настоящей работе), уротоксин и мезомартоксин (ММТХ, Табл. 2). Все эти молекулы демонстрируют превосходную способность различать Kv1.2 по сравнению с Kv1.1 и 1.3, однако MeKTx11-1 проявляет уникальную селективность в отношении Kv1.2: коэффициент селективности Kv1.1/Kv1.2 достигает значения 10550 (для

ММТХ точное значение нельзя рассчитать, так как он был протестирован только в концентрации 50 мкМ против Kv1.3). Это свойство может быть полезным в дальнейшей работе, например для характеристики совместной экспрессии этих очень сходных изоформ Kv в нервной системе.

MeKTx11-1 и 3 являются первыми представителями подсемейства  $\alpha$ -KTx1 с ярко выраженной Kv1.2-селективностью. Эта изоформа канала связана с рядом неврологических заболеваний, таких как эпизодическая атаксия и эпилептическая энцефалопатия [44, 45]. Ввиду возможности использования полипептидов, полученных из яда, в качестве терапевтических агентов, MeKTx11-1 и 3 могут найти применение в рациональном дизайне лекарств, но в этом случае их полезность ограничена нарушениями, связанными с мутациями, которые приводят к увеличению проводимости 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.

### 3.2 Получение селективных лигандов на основе известных токсинов

Другим способом получения селективных лигандов может служить мутагенез уже известных токсинов. В этом разделе мы взяли токсины MeKTx13-3 и ChTx и модифицировали их, чтобы получить такие пептиды, которые будут избирательно действовать на определенную изоформу канала. При выборе мутаций мы ориентировались на моделирование комплексов токсина с каналом и оценку влияния введенных замен на количество образующихся связей, а также опирались на литературные данные. Моделирование позволило нам спроектировать пептид MeKTx13-3\_AAAR, а литературные данные использовались для предложения замен, которые привели к получению пептидов MeKTx13-3\_RMRH и ChTx\_M29I.

#### 3.2.1 MeKTx13-3\_AAAR и MeKTX13-3\_RMRH

##### *Стратегия выбора мутаций*

По аминокислотной последовательности MeKTx13-3 (Рис. 16А) идентичен VmKTX, выделенному из *Olivierus martensii*, близкого родственника *M. eupeus*. Поскольку трехмерная структура VmKTX известна (PDB ID: 1BKT) [189], мы использовали ее для моделирования комплексов MeKTx13-3 с каналами K<sub>v</sub>1.1–1.3. Затем модели подвергались МД (Рис. 17А–В). Чтобы изучить различия во взаимодействии MeKTx13-3 с изоформами K<sub>v</sub>, мы проанализировали межмолекулярные контакты и вклад отдельных а.о. в энергию взаимодействия во время МД с использованием программного пакета IMPULSE.

Было замечено, что в комплексе с K<sub>v</sub>1.2 токсин MeKTx13-3 не образует никаких π-катионных контактов или стэкинг-взаимодействий, в отличие от комплекса с K<sub>v</sub>1.1 или 1.3. Это наблюдение хорошо согласуется с электрофизиологическими измерениями, которые показали, что MeKTx13-3 более всего активен по отношению к каналам K<sub>v</sub>1.1 и 1.3. Мы отметили следующие специфические контакты между токсином и отдельными изоформами каналов. (1) Остаток K15 в структуре MeKTx13-3 образует солевой мостик с остатком E353 канала K<sub>v</sub>1.1 (Рис. 17Б). Аналогичный контакт с D351 (Рис. 17Г) не наблюдается в комплексе с K<sub>v</sub>1.2, по-видимому, из-за того, что соседний остаток R350 отталкивает K15. В той же позиции в последовательности K<sub>v</sub>1.3 находится остаток T375, с которым также не было обнаружено контакта, предположительно из-за небольшого размера боковой цепи треонина. (2) Остаток K18 в последовательности MeKTx13-3 образует водородную связь с

остатком S354 канала Kv1.1 и  $\pi$ -катионное взаимодействие с H355; в комплексе с Kv1.2 K18 в последовательности MeKTx13-3 образует водородную связь с Q353 (Рис. 17Б, В).

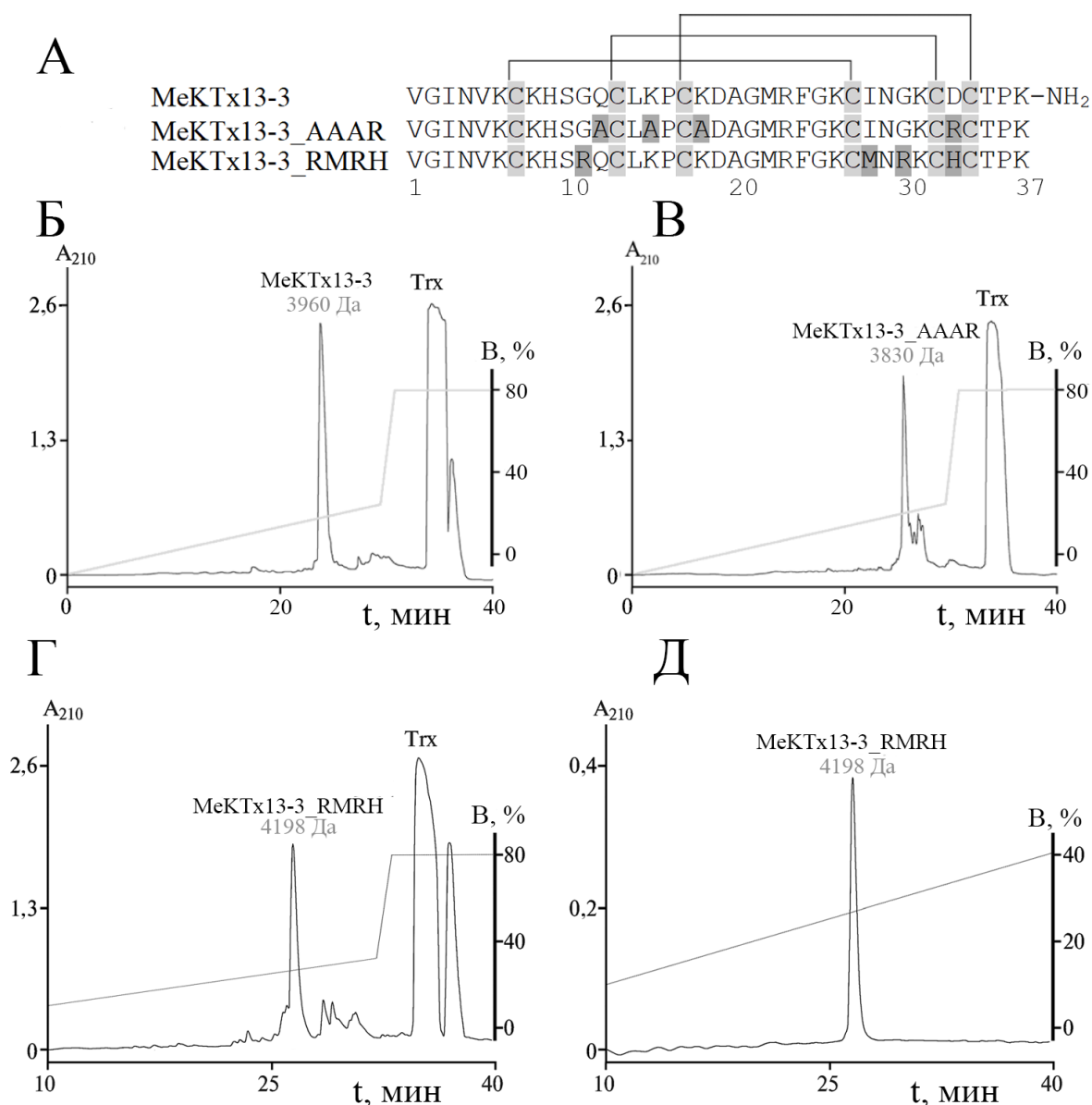


Рисунок 16. Получение MeKTx13-3 и его производных. (А) Выравнивание аминокислотной последовательности MeKTx13-3, MeKTx13-3\_RMRH и MeKTx13-3\_AAAR. Темно-серым цветом обозначены позиции, в которых были введены замены. Остатки цистеина на сером фоне, а линии над последовательностями указывают дисульфидные связи. Нумерация а.о. приведена под последовательностями. (Б–Г) Очистка рекомбинантных MeKTx13-3, MeKTx13-3\_AAAR и MeKTx13-3\_RMRH с помощью ОФ-ВЭЖХ 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.

В комплексе MeKTx13-3 с Kv1.3 конформация петли, содержащей канал-специфичные остатки T375 и G377, при МД такова, что она не достигает K18, поэтому контактов не наблюдается (Рис. 17Г). (3) Остаток Q12 токсина MeKTx13-3 образует водородную связь с остатком D351 канала Kv1.2 (Рис. 17В). Аналогичный контакт с T375 не наблюдается в комплексе с Kv1.3 (Рис. 17Г), поскольку короткая боковая цепь треонина не достигает Q12. В комплексе с Kv1.1 контакта с E353 не обнаружено, так как конформация петли, содержащей специфичные для канала остатки, во время МД препятствует достижению Q12. В дополнение к наблюдаемым специфичным для канала контактам, остаток D33 в последовательности MeKTx13-3 вносит значительный положительный вклад в энергию связывания (отрицательно влияет на сродство) из-за электростатического отталкивания от отрицательно заряженного а.о. в вестибюле поры канала (D377/375/399 в Kv1.1/1.2/1.3, Рис. 17Г).

Фармакологическая характеристика и подробный анализ структуры комплексов позволяют нам предложить несколько точечных замен в MeKTx13-3 для переключения селективности токсина. Поскольку Q12, K15 и K18 формируют множество контактов в комплексах с Kv1.1 и 1.2, общее направление модификаций было 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. В связи с этим нами было предложено производное MeKTx13-3, в котором остатки Q12, K15 и K18 заменены на аланин для снижения сродства токсина к Kv1.1 и 1.2, а D33 заменен 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. 17А).

В свою очередь, анализ данных по мутагенезу VmKTX позволил нам предложить новый вариант. 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 [106]. Среди AgTx<sub>2</sub>, OSK1 и других токсинов, которые имеют остатки R12, M29, R31 и H34 (соответствуют R11, M28, R30 и H33 в токсинах  $\alpha$ -КТх3, лишенных N-концевого остатка глицина), 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 новый высокоселективный блокатор Kv1.3.

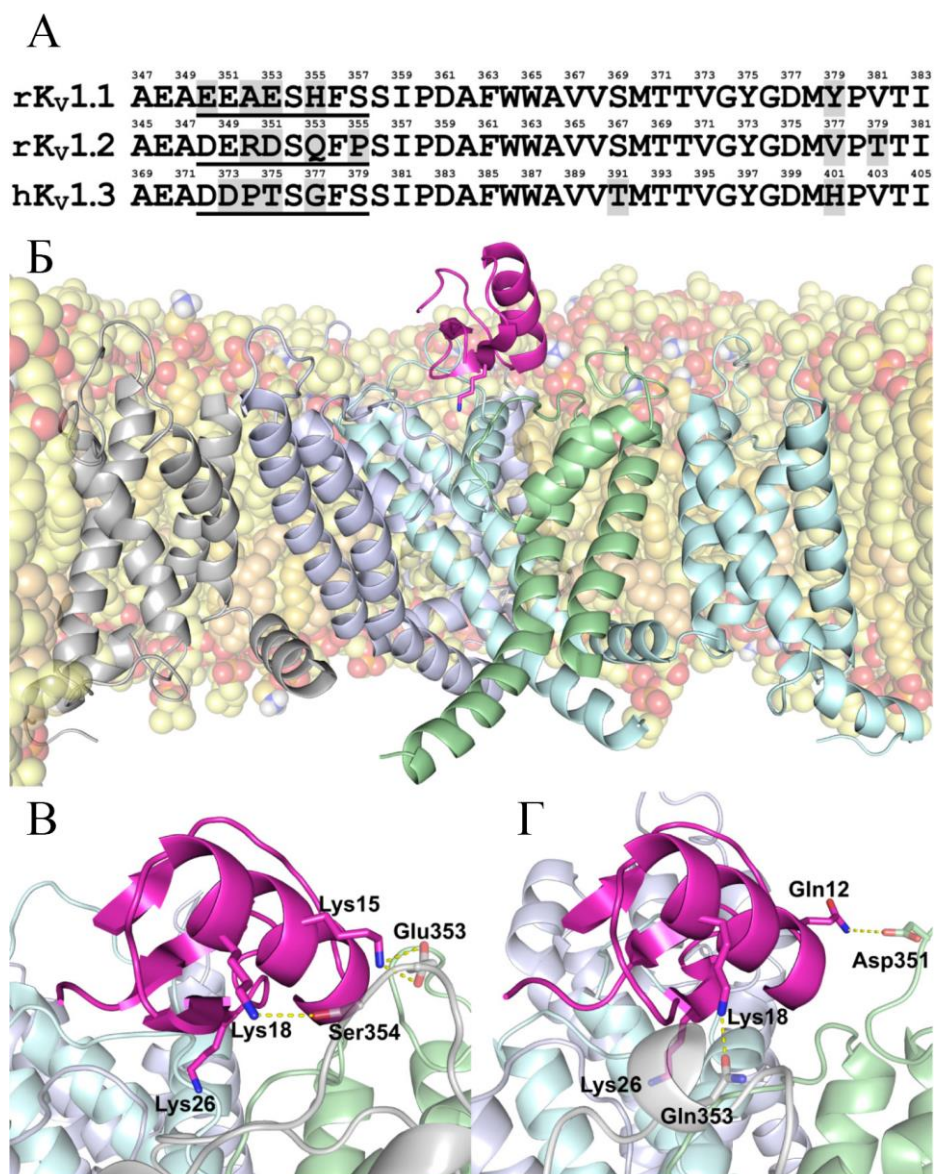


Рисунок 17. (А) Сравнение аминокислотных последовательностей области вестибюля поры каналов K<sub>V</sub>1.1–1.3. Нумерация а.о. приведена над каждой последовательностью; разные а.о. показаны на сером фоне; последовательности петель S5–P, содержащие специфичные для канала а.о., подчеркнуты. (Б–Г) Модель 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 гидратированной липидной бислоистой мембраны. Обозначения даны как на рисунке 11. MeKTx13-3 представлен розовым цветом; остаток K26 (блокирующий пору канала) показан в виде стержневой модели. (В, Г) Крупный план области вестибюля поры канала в комплексах MeKTx13-3—K<sub>V</sub>1.1 и MeKTx13-3—K<sub>V</sub>1.2 соответственно. 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 показаны пунктирными желтыми линиями. Липиды не показаны для наглядности.



### Получение рекомбинантных токсинов

Рекомбинантный MeKTx13-3 и его производные MeKTx13-3\_AAAR (MeKTx13-3 со следующими заменами: Q12A, K15A, K18A и D33R) и MeKTx13-3\_RMRH (G11R, I28M, G30R и D33H; Рис. 16А) получали в составе гибридного белка с белком-помощником Ttx (Рис. 16Б, В). Для этого при помощи ПЦР были получены гены, кодирующие целевые пептиды, которые затем были встроены в экспрессионный вектор pET-32b по сайтам рестрикции BamHI и KpnI. После этого, трансформировали клетки *E. coli* SHuffle T7 Express, которые затем выращивались в жидкой среде до середины лог-фазы. Экспрессию целевых генов индуцировали ИПТГ, клетки инкубировали при комнатной температуре в течение 16 ч. Гибридный белок выделяли при помощи разрушения клеток при помощи ультразвука, за которым следовала металл-хелатная аффинная хроматография. Полученные гибридные белки гидролизовали легкой цепью энтеропептидазы человека при 37°C в течение 16 часов. После этого гидролизат разделяли при помощи ОФ-ВЭЖХ на колонке Jupiter C5. Определение пика, который соответствует целевому пептиду, производилось при помощи МАЛДИ МС. Для пептидов MeKTx13-3, MeKTx13-3\_AAAR и MeKTx13-3\_RMRH расчетные моноизотопные массы  $[M+H]^+$  составили 3963, 3832 и 4198 Да соответственно, экспериментально измеренные совпали с расчетными. Конечный выход пептидов составил  $\approx 5$  мг на 1 л среды.

### Изучение активности полученных пептидов

В первую очередь мы сравнили активность природного и рекомбинантного MeKTx13-3 на канале  $K_v1.1$ . Рекомбинантный пептид оказался менее активным, чем нативный токсин (значения  $IC_{50}$   $6,7 \pm 2,7$  и  $1,9 \pm 0,2$  нМ соответственно), что, скорее всего, связано с отсутствием у него С-концевого амидирования. Снижение активности оказалось небольшим, и мы решили использовать рекомбинантный пептид MeKTx13-3 в дальнейших исследованиях.

После этого, мы сравнили активность рекомбинантных пептидов MeKTx13-3 и MeKTx13-3\_AAAR в концентрации 10 нМ, а MeKTx13-3\_RMRH в концентрации 1 нМ против четырех изоформ  $K_v$  ( $K_v1.1-1.3$  и 1.6), экспрессированных в ооцитах *X. laevis* (Рис. 18). Рекомбинантный MeKTx13-3, как и природный токсин, почти полностью (>95%) ингибировал калиевые токи через  $K_v1.1$ ; каналы  $K_v1.2$ , 1.3 и 1.6 были заблокированы на  $\approx 25\%$ ,  $\approx 50\%$  и  $\approx 15\%$  соответственно. В концентрации 10 нМ MeKTx13-3\_AAAR блокировал  $K_v1.3$  на  $\approx 50\%$ , тогда как  $K_v1.1$ , 1.2 и 1.6 были заблокированы только на  $\approx 15\%$ ,  $\approx 5\%$  и  $\approx 10\%$

соответственно. MeКТх13-3\_RMRH в концентрации 1 нМ оказался более активным в отношении Kv1.1. В больших концентрациях он также ингибировал изоформы Kv1.2, 1.3 и 1.6.

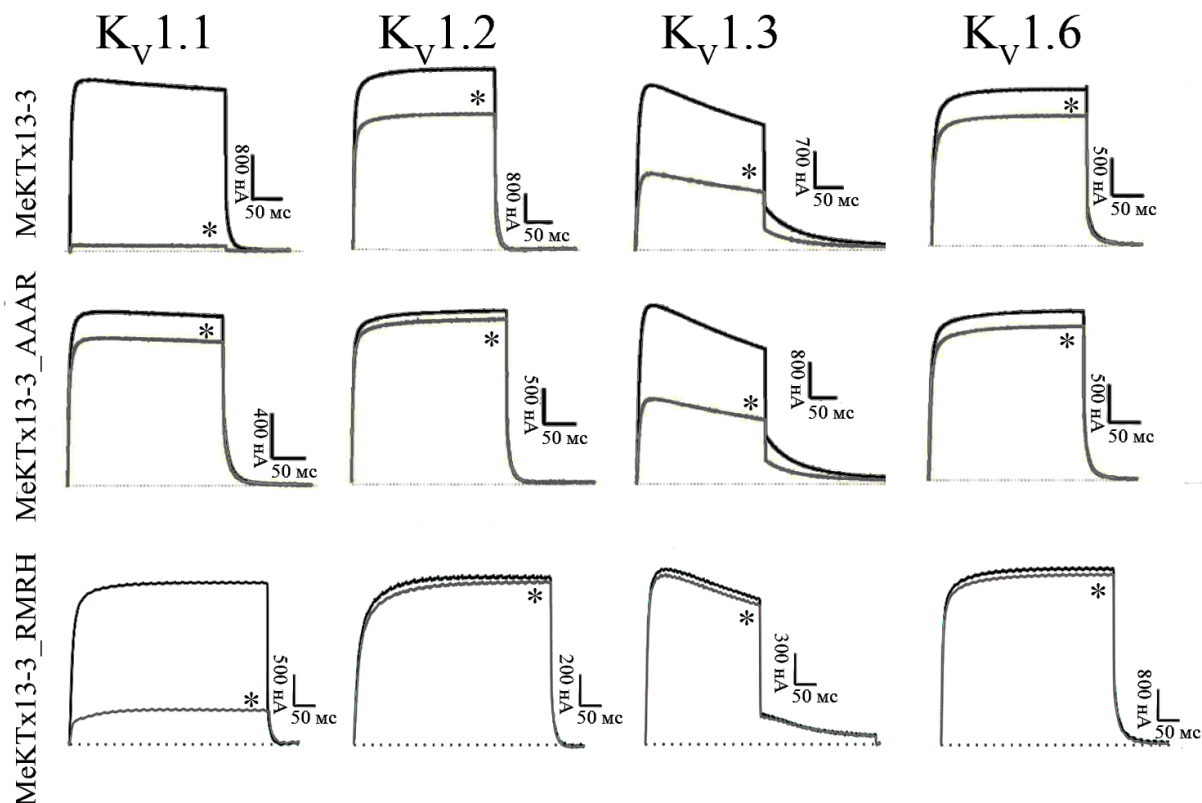


Рисунок 18. Измерение активности MeКТх13-3, MeКТх13-3\_AAAR и MeКТх13-3\_RMRH методом двухэлектродной фиксации потенциала. Записи токов через каналы Kv1.1–1.3 и 1.6 в контроле и после добавления токсина (отмечены звездочкой) в концентрации 10 нМ для MeКТх13-3 и MeКТх13-3\_AAAR, 1 нМ для MeКТх13-3\_RMRH.

Наконец, мы построили кривые доза-ответ для чувствительных каналов (Рис. 19; Табл. 9 для значений ИК<sub>50</sub>). MeКТх13-3\_AAAR продемонстрировал сравнимую с нативным MeКТх13-3 активность в отношении Kv1.3 (ИК<sub>50</sub> = 8,9 ± 0,9 нМ для природного токсина и 9,1 ± 0,4 нМ для мутанта), тогда как его сродство к Kv1.1 резко снизилось (ИК<sub>50</sub> = 541,5 ± 48,6 нМ вместо 1,9 ± 0,2 нМ для природного MeКТх13-3). MeКТх13-3\_AAAR также показал сниженную активность в отношении Kv1.2 (ИК<sub>50</sub> = 208,2 ± 15,2 нМ по сравнению с 105,9 ± 14,6 нМ для MeКТх13-3) и Kv1.6 (ИК<sub>50</sub> = 1522,3 ± 183,4 нМ вместо 63,4 ± 4,5 нМ). MeКТх13-3\_RMRH, вопреки ожиданиям, оказался с увеличенной аффинностью к Kv1.1 и 1.2 каналам, ИК<sub>50</sub> составили 0,11 ± 0,02, 10,7 ± 0,8, 8,1 ± 0,2 и 16,3 ± 1,0 нМ для Kv1.1, 1.2,

1.3 и 1.6 соответственно ( $n \geq 3$ ). 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 и ожидалось, селективность MeKTx13-3\_AAAR сместилась в сторону Kv1.3. Для оценки специфичности токсина к конкретной изоформе канала (в нашем случае Kv1.3) использовался фактор селективности, т.е. отношение значений ИК<sub>50</sub> (или K<sub>d</sub>) для двух ближайших по аффинности каналов. Для MeKTx13-3 коэффициент селективности Kv1.1/Kv1.3 оказался равен примерно 0,2, тогда как для MeKTx13-3\_AAAR этот параметр изменился на 60. Существует ряд более специфичных для Kv1.3 токсинов и их производных, например HsTx1, Vm24 или moKa1, демонстрирующих факторы селективности (Kv1.1/Kv1.3) 500 или даже 1000. Мы сравнили аминокислотные последовательности нескольких десятков токсинов из подсемейств  $\alpha$ -KTx1-4, 11, 12, 15-18 и 21-24 примерно одной длины и со схожим с MeKTx13-3 расположением дисульфидных связей и обнаружили, что два а.о., которые мы заменили в данной работе (Q12 и K18) являются консервативными. Во многих токсинах в этих позициях встречаются Q/E и K/R соответственно. Оставшиеся два а.о. (K15 и D33) являются переменными. Все четыре а.о., по-видимому, вносят свой вклад во взаимодействие токсинов с каналами, и в настоящее время нельзя сказать, почему два из них консервативны, а два других переменны. Более того, мы не можем о том, есть ли корреляция между этими а.о. и аффинностью или селективностью токсина. Можно предположить, что замены, которые мы ввели в MeKTx13-3, могут повлиять на изменение селективности в других токсинах  $\alpha$ -KTx3 аналогично. Однако на данном этапе развития науки мы не можем предсказать специфичность токсинов по первичной структуре. Представляется, что в каждом случае требуются эксперименты по молекулярному моделированию и детальный анализ контактов. Это связано с тем, что одно изменение в последовательности может фактически повлиять на то, как взаимодействуют другие а.о. — из-за стерических затруднений или эффектов упаковки, электростатического притяжения или отталкивания, перетасовки водородных связей или локальных перестроек укладки, которые нелегко разрешить на уровне первичных структур. Например, в случае MeKTx13-3 остаток K15, по-видимому, образует солевой мостик с E353 в Kv1.1 (Рис. 17В). Простое рассмотрение первичных структур предсказывает тот же солевой мостик в Kv1.2, поскольку он имеет D351 в том же положении (Рис. 17Г). Однако этот контакт не устанавливается при молекулярном моделировании из-за соседнего R350, который отталкивает K15. Сходным образом, остатки K18 и Q12 в структуре MeKTx13-3 создают специфичные для каналов контакты из-за различной укладки внеклеточных петель канала, а не только аминокислотных замен.

Таблица 9. Значения  $IC_{50}$  (в нМ), рассчитанные для MeКТx13-3 и его производных MeКТx13-3\_AAAR и MeКТx13-3\_RMRH по отношению к  $K_v1.1-1.3$  и 1.6.

Токсин	$K_v1.1$	$K_v1.2$	$K_v1.3$	$K_v1.6$
MeКТx13-3	$1,9 \pm 0,2$	$105,9 \pm 14,6$	$8,9 \pm 0,9$	$63,4 \pm 4,5$
MeКТx13-3_AAAR	$541,5 \pm 48,6$	$208,2 \pm 15,2$	$9,1 \pm 0,4$	$1522,3 \pm 183,4$
MeКТx13-3_RMRH	$0,11 \pm 0,02$	$10,7 \pm 0,8$	$8,1 \pm 0,2$	$16,3 \pm 1,0$

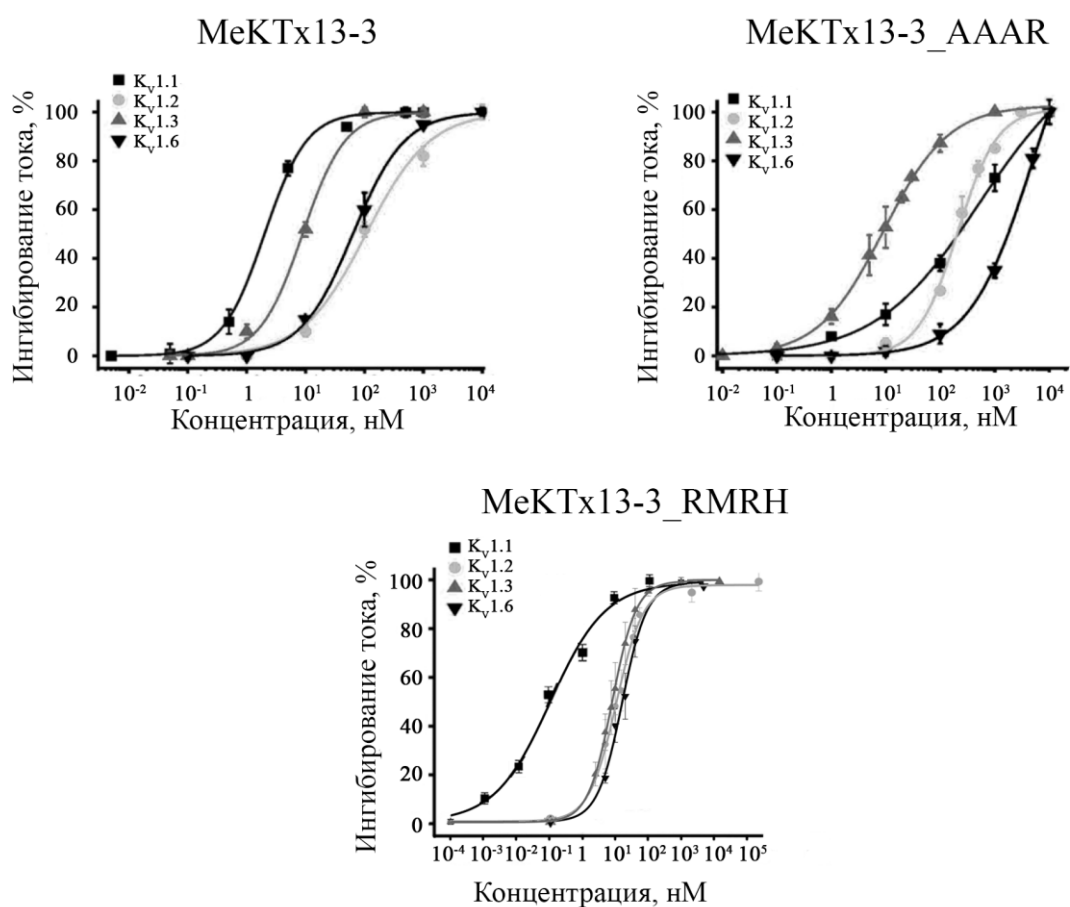


Рисунок 19. Кривые зависимости ингибирования тока от концентрации пептида для MeКТx13-3 и его производных.

### Молекулярное моделирование

Для выяснения причин неожиданной специфичности MeКТx13-3\_RMRH к  $K_v1.1$  мы выполнили еще один раунд компьютерного моделирования комплексов этого пептида с  $K_v$ -каналами. Мы построили модели комплексов MeКТx13-3\_RMRH с каналами  $K_v1.1-1.3$ , рассчитали траектории МД комплексов, встроенных в липидный бислой, проанализировали межмолекулярные контакты и вклады а.о. в энергию взаимодействия канал–токсин, а также

сравнили результаты с данными для MeKTx13-3 (Рис. 20, 21Б–Г). Заметим, что рассчитанные абсолютные значения энергии должны рассматриваться только в сравнении с другими расчетными значениями.

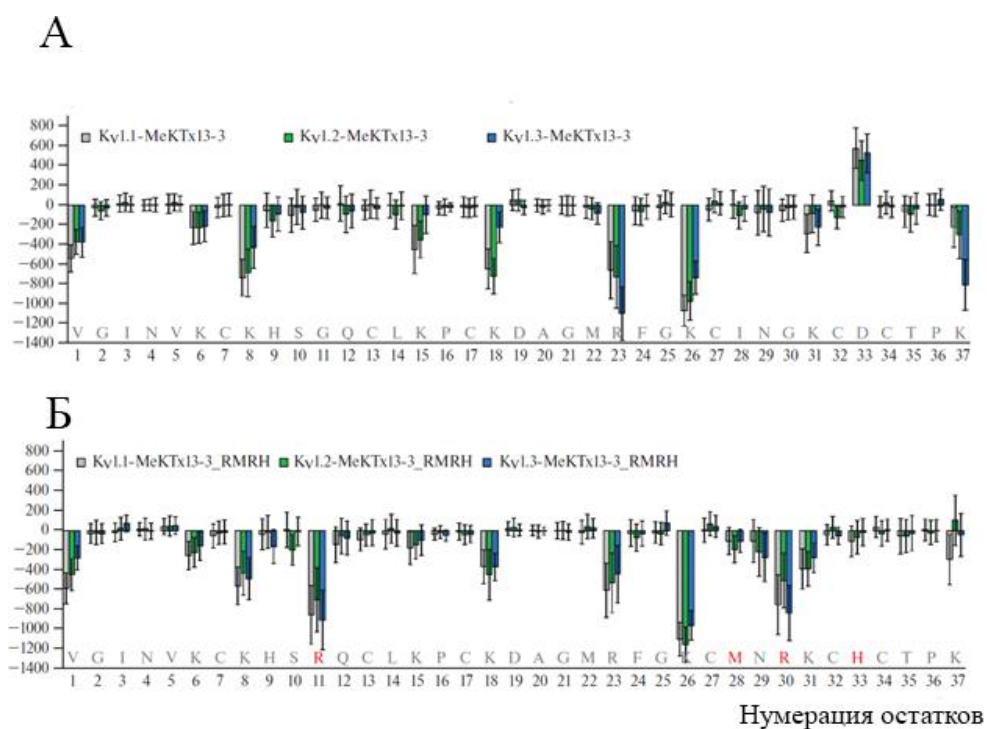


Рисунок 20. Профили энергии взаимодействия MeKTx13-3 (А) и MeKTx13-3\_RMRH (Б) в комплексах с Kv1.1–1.3. Гистограммы показывают вклады отдельных а.о. в энергию взаимодействия, усредненные по траектории МД. Планки погрешностей отражают стандартные отклонения. Аминокислотные последовательности показаны над номерами а.о.; замены в MeKTx13-3\_RMRH показаны красным шрифтом.

По результатам компьютерного исследования, замена I28M не приводит к заметному изменению межмолекулярных контактов или энергии межмолекулярных взаимодействий (Рис. 20). Число и характеристика межмолекулярных контактов, образованных остатком 28 в комплексах MeKTx13-3 и MeKTx13-3\_RMRH, различаются незначительно. Остаток D33 у MeKTx13-3 вносит значительный положительный вклад в энергию взаимодействия (снижает аффинность; Рис. 20) из-за электростатического отталкивания от консервативного отрицательно заряженного а.о. в вестибуле канала (D377/375/399 у Kv1.1/1.2/1.3, см. Рис. 21А). Поэтому замена D33H в MeKTx13-3\_RMRH нивелирует неблагоприятный энергетический вклад. Помимо этого, остаток H33 образует водородную связь в комплексе с Kv1.1 (H33–G376, см. Рис. 21Б). Таким образом, очевидны преимущества замены D33H для

стабилизации комплекса MeKTx13-3\_RMRH—K<sub>v</sub>1.1. Однако скорее всего этот а.о. не оказывает влияние именно на увеличение специфичности к K<sub>v</sub>1.1, поскольку (а) Н9 образует две водородные связи с K<sub>v</sub>1.2, что может вносить вклад в увеличение сродства к этому каналу; (б) замена D33R в MeKTx13-3\_AAAR не предотвратила уменьшение сродства к K<sub>v</sub>1.1, вызванное другими заменами.

R11 и R30, замененные у MeKTx13-3\_RMRH, вносят значительный благоприятный вклад в энергию взаимодействия (Рис. 20). Более того, эти модификации приводят к образованию двенадцати (четверть от общего числа) межмолекулярных контактов: трех солевых мостиков (R11–D361, R11–D377, R30–D361, см. Рис. 21В, Г), трех водородных связей, а также трех π-π и трех π-катионных взаимодействий (R11–H355, R11–F356, R30–F356) в комплексе с K<sub>v</sub>1.1. Стоит отметить, что аналогичные контакты невозможны в комплексах MeKTx13-3 с K<sub>v</sub>, поскольку остатки G11 и G30 токсина не имеют боковых цепей.

Тем не менее, контакты, образованные R11 и R30, сами по себе не объясняют высокую специфичность MeKTx13-3\_RMRH к K<sub>v</sub>1.1. Эти замены не вызывают столь значительного увеличения сродства к K<sub>v</sub>1.2 и 1.3, хотя они также участвуют во множестве взаимодействий с этими двумя каналами. Очевидно, что контакты R11 и R30 способствуют оптимальному положению токсина и ориентации участков канала для возникновения других взаимодействий в комплексе с K<sub>v</sub>1.1, что в конечном итоге и обуславливает специфичность пептида. В частности, контакты R30–D361 и R30–F356 фиксируют участок канального белка между остатками F356 и D361 рядом с токсином в комплексе MeKTx13-3\_RMRH—K<sub>v</sub>1.1. Такое фиксированное положение может снижать подвижность соседнего фрагмента канала между остатками E353 и H355, что приводит к образованию солевого мостика между остатками E353 канала с остатком пептида K31 (Рис. 21). Мы не наблюдали подобных контактов в комплексах пептида с K<sub>v</sub>1.2/1.3, поскольку боковые цепи соответствующих остатков D351/T375 не могут достичь ε-аминогруппы K31.

Благодаря особому положению токсина в комплексе с K<sub>v</sub>1.1 образуется контакт R36–Y379. При этом образуется водородную связь между атомами основной цепи R36 у MeKTx13-3\_RMRH и боковой цепью K<sub>v</sub>1.1-специфичного остатка Y379 (Рис. 21В), чего не происходит в комплексе MeKTx13-3—K<sub>v</sub>1.1. Аналогичные контакты не наблюдаются в комплексах с другими каналами: боковая цепь V377 у K<sub>v</sub>1.2 слишком коротка и не имеет соответствующей функциональной группы, а боковая цепь H401 у K<sub>v</sub>1.3 не может достичь основной цепи R36.

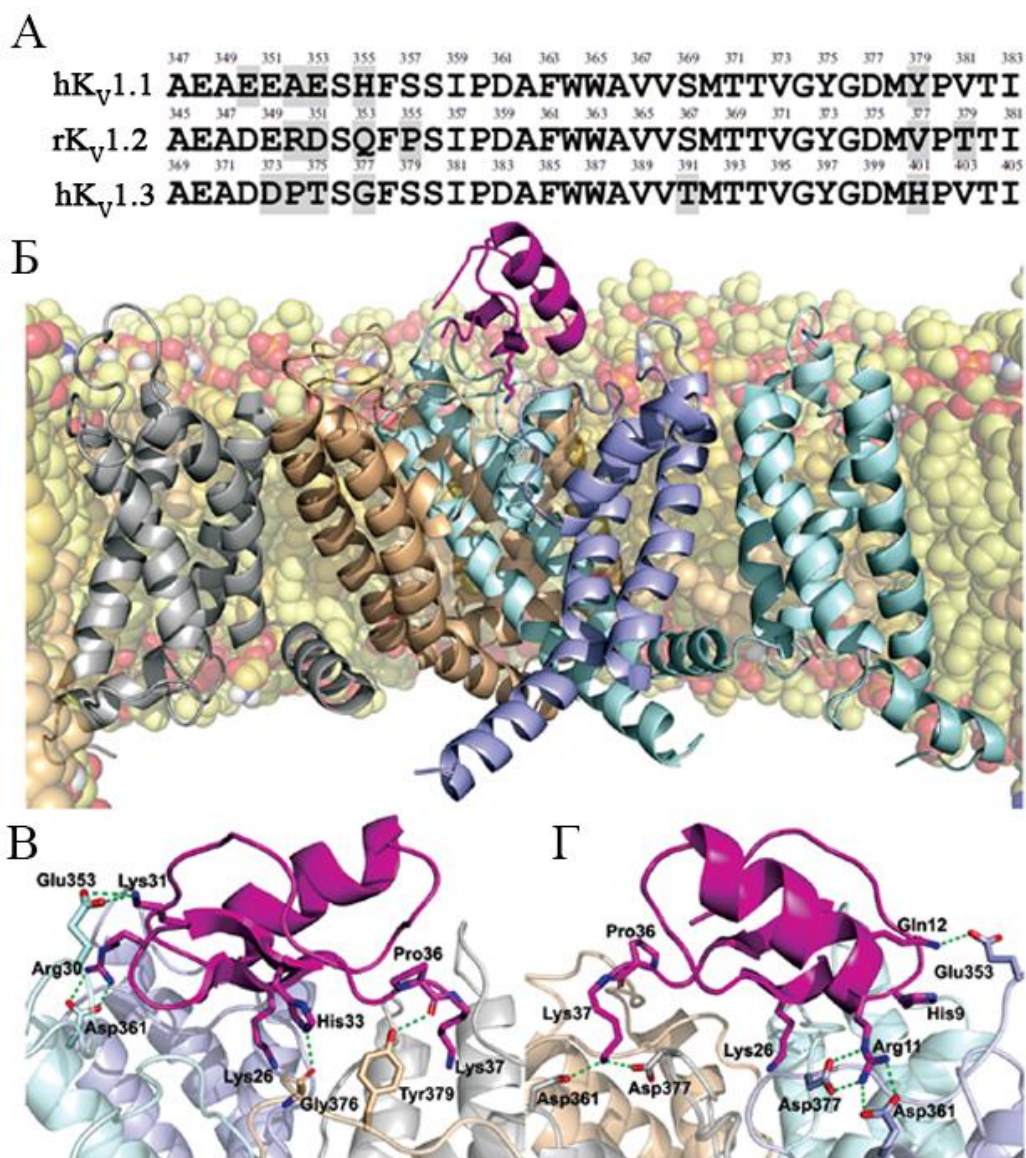


Рисунок 21. Модель структуры MeKTx13-3\_RMRH в комплексе с K<sub>v</sub>1.1. (А) Выравнивание аминокислотных последовательностей внеклеточных участков поры каналов K<sub>v</sub>1.1–1.3. Нумерация а.о. указана над каждой последовательностью; отличающиеся а.о. показаны на сером фоне. (Б) Общая структура комплекса MeKTx13-3\_RMRH—K<sub>v</sub>1.1 в гидратированном липидном бислое после 500 нс МД. Обозначения аналогичны рисунку 11. MeKTx13-3\_RMRH обозначен розовым цветом; остаток K26 (закупоривает пору канала) отображен в виде стержневой модели. (В, Г) Крупный план вестибуля поры канала с панели Б (вид слева и справа соответственно). Канал показан в полупрозрачном виде. Липиды удалены. Боковые цепи K26 и других а.о., участвующих в межмолекулярных контактах, отображены в виде стержневых моделей; для остатков P36, K37 и G376 показаны атомы основной цепи. Полярные контакты (водородные связи и солевые мостики) показаны зелеными пунктирными линиями. В момент, обозначенный на панели Г, Н9 не образует контакта с E353.

Очевидно, что формирование двух солевых мостиков K37–D361 и K37–D377, а также среднеживущих водородных связей H9–E353 и Q12–E353 (Рис. 21Г) также становится возможными в комплексе MeKTx13-3\_RMRH—Kv1.1 в результате особого пространственного расположения токсина относительно канального белка. Следует отметить, что аналогичные контакты, образованные K37, наблюдаются в комплексе MeKTx13-3 с Kv1.3 (K37–D383, K37–D399), и такие же контакты, образованные H9 и Q12, обнаружены в комплексе MeKTx13-3 с Kv1.2 (H9–D351, Q12–D351), но не в комплексах MeKTx13-3\_RMRH с любым из этих двух каналов. Потеря этих контактов также может быть объяснена несколько различающимся положением токсина дикого типа и его мутанта в комплексах с Kv1.2 и 1.3.

Благодаря особому положению пептида MeKTx13-3\_RMRH, которое обусловлено взаимодействиями остатков R11 и R30 в комплексах с каналом Kv1.1, элиминируются некоторые контакты, наблюдаемые в комплексах с MeKTx13-3, а также появляются новые взаимодействия. Так, в комплексах MeKTx13-3\_RMRH с Kv1.1, 1.2 и 1.3 наблюдаются 45, 29 и 23 специфических контакта соответственно, и лишь 10, 8 и 3 из них идентичны для MeKTx13-3 и MeKTx13-3\_RMRH (Приложение 1). Скорее всего, переход от MeKTx13-3 к MeKTx13-3\_RMRH привел к увеличению числа контактов, что приводит к увеличению сродства к Kv1.1 и 1.2 (поскольку мутант образует больше контактов в этих двух комплексах), но не влияет на сродство к Kv1.3.

Согласно результатам компьютерного анализа межмолекулярных контактов, MeKTx13-3\_RMRH образует 23 специфических и 245 гидрофобных контактов с Kv1.3, а MeKTx13-3 — 30 и 263 соответственно. Несмотря на это, MeKTx13-3\_RMRH формирует большее число долгоживущих водородных связей и солевых мостиков в комплексе с Kv1.3 (10 и 5 соответственно), чем токсин дикого типа (8 и 4). Предположительно, сходная активность токсинов в отношении Kv1.3 связана с перераспределением количества и характеристики контактов.

По результатам вычислительного анализа оказалось, что остатки R11 и R30 играют основную роль в селективном связывании MeKTx13-3\_RMRH с Kv1.1. В комплексах с Kv-каналами эти а.о. формируют большое количество межмолекулярных взаимодействий, которые стабилизируют специфическое положение токсина относительно канального белка. Особое расположение токсина обеспечивает формирование дополнительных контактов (остатками K31, R36, K37, а также H9 и Q12) в комплексе с Kv1.1, что, как мы полагаем, лежит в основе высокого сродства к этой изоформе.



### 3.2.2 Получение рекомбинантного пептида ChTx\_M29I

При анализе литературы была обнаружена работа, в которой обсуждалось взаимодействие токсина ChTx с каналом *D. melanogaster* Shaker [190]. В канале дикого типа имеется остаток T449, и при взаимодействии с ChTx образуется высокоаффинный комплекс ( $K_d \approx 0,063$  нМ). Однако, если в канале имеется замена T449F, а в токсине 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. 22) и обнаружили, что у человека в том же положении находятся различные а.о. Так как известно, как действует ChTx дикого типа на гомологичные каналы, то мы решили проверить, изменится ли аффинность ChTx с заменой M29I и сохранится ли тенденция ухудшения взаимодействия пептида с каналом, у которого в том же положении, что и остаток T449 в канале Shaker, находится большой ароматический а.о. (Рис. 22, выделены полужирным шрифтом)

Shaker	416	FAEAGSENSFFKSI	PDAFWWAVVTMTTVGYGDM	<b>T</b> PVGVW	454
hK <sub>v</sub> 1.1	346	FAEAE <del>EEAE</del> SHFS	SIPDAFWWAVVSM	TTVGYGDM <b>Y</b> PVTIG	384
hK <sub>v</sub> 1.2	348	FAEADERESQFP	SIPDAFWWAVVSM	TTVGYGDM <b>V</b> PTIG	386
hK <sub>v</sub> 1.3	418	FAEADDPTSGFSS	SIPDAFWWAVVTMTTVGYGDM	<b>H</b> PVTIG	456
hK <sub>v</sub> 1.6	396	FAEADDDDSLFP	SIPDAFWWAVVTMTTVGYGDM	<b>Y</b> PMTVG	434

Рисунок 22. Сравнение аминокислотных последовательностей порового региона канала Shaker и K<sub>v</sub>1. Серым фоном показаны различающиеся а.о., полужирным выделены ключевые а.о., предположительно взаимодействующие с остатком токсина M/I29.

#### Получение рекомбинантного пептида

Получение рекомбинантного пептида в составе гибридного белка с Trx велось аналогично вышеупомянутым примерам. Выход целевого пептида составил 4 мг с 1 л питательной среды (Рис. 23).

#### Электрофизиологическое исследование

Полученный пептид ChTx\_M29I был исследован на K<sub>v</sub>-каналах аналогично. По сравнению с обычным ChTx его аффинность к каналам K<sub>v</sub>1.1 и 1.6 упала: в концентрации 2 мкМ

блок тока через каналы составил  $3,1 \pm 2,7\%$  и  $9,6 \pm 0,6\%$  соответственно (Рис. 24, Табл. 10). Токсин дикого типа является слабо селективным по отношению к каналу Kv1.3 (Табл. 10), 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 ( $ИК_{50} = 6,0 \pm 0,4$  пМ). Фактор селективности для каналов Kv1.2/Kv1.3 составил 680. Таким образом, ChTx\_M29I является примером селективного лиганда Kv1.2.

Так как тут мы наблюдаем падение аффинности ChTx\_M29I по отношению к каналам Kv1.1 и 1.6, то скорее всего это происходит из-за наличия остатков Y379 и Y429 у них соответственно. В отношении Kv1.3 тоже видно падение активности, скорее всего это связано с наличием крупного а.о. (H451) в этой позиции. Увеличение активности по отношению к каналу Kv1.2 скорее всего связано с тем, что в обсуждаемой позиции у него находится а.о. с короткой и гидрофобной боковой цепью (V381).

Таблица 10. Сравнение аминокислотных последовательностей и фармакологическая характеристика харибдотоксина (ChTx) и его мутанта ChTx\_M29I. Светло-серым выделены остатки цистеина, темно-серым обозначена позиция, в которую вносилась замена. Z обозначает остаток пироглутаминовой кислоты. Указаны значения  $K_d$  (для ChTx) [99, 100] и  $ИК_{50}$  (для ChTx\_M29I) в нМ.

Пептид	Последовательность	Kv1.1	Kv1.2	Kv1.3	Kv1.6
ChTx	ZFTNVSC <b>TTTSKEC</b> WSVC <b>Q</b> RLHNTSRGK <b>CMNKK</b> CRCYS	1500	9	0,19	22
ChTx_M29I	ZFTNVSC <b>TTTSKEC</b> WSVC <b>Q</b> RLHNTSRGK <b>C</b> IN <b>KK</b> CRCYS	2000/3,1 <sup>1</sup>	0,006	4,1	2000/9,6

<sup>1</sup>“А/Б” означает, что в концентрации А нМ пептид блокирует ток через канал на Б процентов.

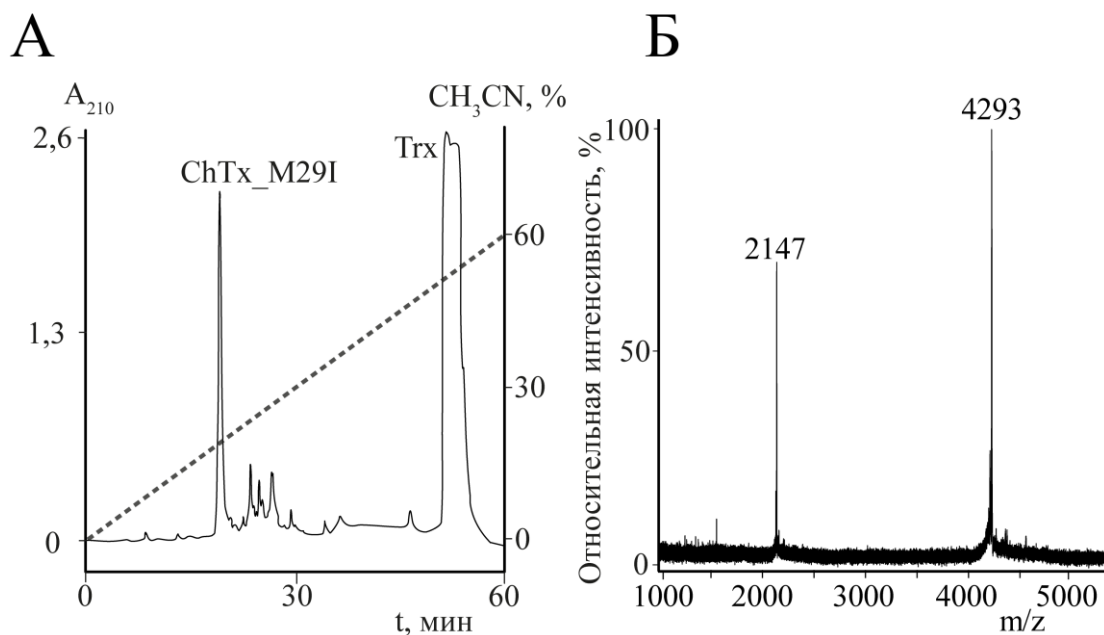


Рисунок 23. (А) Хроматографическое разделение продуктов гидролиза гибридного белка Trx-ChTx\_M29I легкой цепью энтеропептидазы человека. (Б) Спектр очищенного ChTx\_M29I, полученный при помощи МАЛДИ масс-спектрометрии в рефлексорном режиме, показаны моноизотопные массы. Расчетная моноизотопная масса  $[M+H]^+$  составляет 4293 Да, экспериментально измеренная — тоже 4293 Да.

Мы предполагаем, что такой эффект увеличения аффинности связан с Ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями между а.о., если предполагать, что ChTx\_M29I располагается в вестибюле поры канала аналогично ChTx из структуры комплекса с химерным каналом Kv1.2/2.1 [30]. При таком расположении остаток M29 токсина сближен с остатком V381 канала (Рис. 25). При наличии в этом положении большого ароматического а.о. скорее всего возникают стерические затруднения, что ведет к падению аффинности.

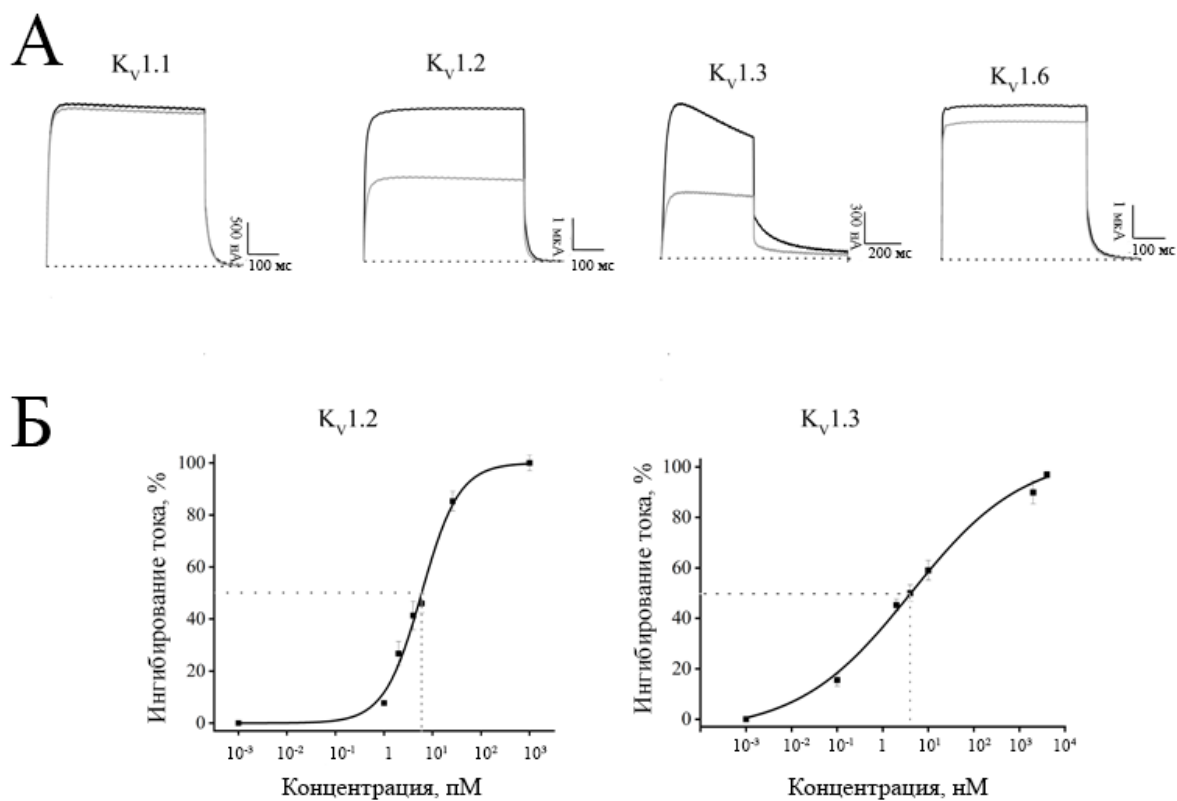


Рисунок 24. Фармакологическая характеристика пептида ChTx\_M29I. (А–Г) Записи токов через мембрану ооцитов в контроле (черные кривые) и в присутствии пептида (2 мкМ для  $K_v1.1$  и 1.6, 6 пМ для  $K_v1.2$  и 4 нМ для  $K_v1.3$ ; серые кривые). (Д, Е) Кривые доза-ответ для каналов  $K_v1.2$  и 1.3, пунктирными линиями показаны значения  $IC_{50}$  ( $n \geq 3$ ).

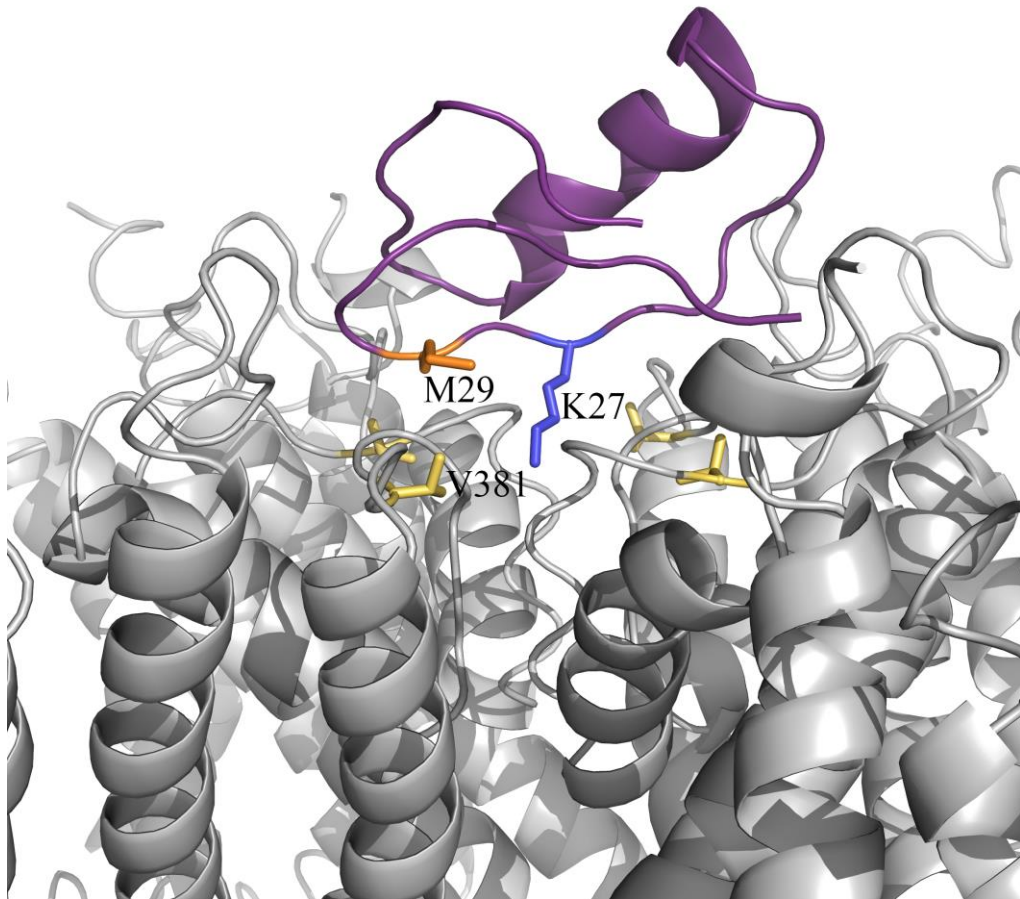


Рисунок 25. Структура комплекса ChTx с каналом  $K_v1.2/2.1$ . Канал показан серым, остаток V381 выделен желтым; токсин показан фиолетовым, K27 выделен синим, M29 — оранжевым.

### 3.3 Искусственные пептиды, полученные на основе $\alpha$ -гарпининов

Как упоминалось ранее в обзоре литературы, в нашей лаборатории уже проводились эксперименты по получению лигандов  $K_V$ -каналов на основе защитного пептида из пшеницы [174, 175]. Мы предполагаем, что такой каркас можно использовать в качестве шаблона для получения селективных лигандов  $K_V$ -каналов. Мы сконцентрировались на увеличении аффинности пептида Tk-hefu-2 к каналу  $K_{V1.3}$ . Мы предположили, что увеличение общего положительного заряда молекулы на поверхности, которая взаимодействует с каналом, должно привести к увеличению аффинности ко всем  $K_V$ -каналам, и, в частности,  $K_{V1.3}$ . Для того, чтобы предложить такие аминокислотные замены мы прибегли к нескольким раундам молекулярного моделирования, результаты которого мы подтверждали экспериментально.

#### 3.3.1 Получение и изучение пептида Tk-hefu-10

##### *Молекулярное моделирование и новые замены в структуре Tk-hefu-2*

Была создана модель комплекса Tk-hefu-2— $K_{V1.3}$ , при анализе которой мы предложили 11 аналогов Tk-hefu-2 с потенциально более высоким сродством к  $K_{V1.3}$  (Tk-hefu-5, Tk-hefu-6 и Tk-hefu-2\_v1–v9, Табл. 11). Стратегия заключалась в том, чтобы ввести заряженные а.о. в Tk-hefu-2 так, чтобы на предполагаемой контактной поверхности с  $K_{V1.3}$  было 1) больше положительно заряженных а.о. или 2) меньше отрицательно заряженных а.о.

Проведено моделирование канала  $K_{V1.3}$  в комплексе с предложенными пептидами (Tk-hefu-5, Tk-hefu-6 и Tk-hefu-2\_v1–v9, Табл. 11), рассчитаны траектории МД, проведен вычислительный анализ контактных поверхностей и энергетического вклада а.о. в комплексообразование. Надежность смоделированных комплексов оценивалась путем независимого докинга без использования концепции «диады». Тщательный анализ результатов докинга не показал каких-либо преимуществ по сравнению с «диадными» моделями, поэтому мы использовали последние. Стабильность исследуемой молекулярной системы была подтверждена путем удлинения выбранных траекторий МД еще на 400 нс. Вклад отдельных а.о. в энергию межмолекулярного взаимодействия оценивали с использованием программного обеспечения IMPULSE и инструмента g\_mmpbsa [191]. Анализ вычислений, выполненных этими двумя способами, показал, что они обладают схожей зависимостью во вкладе отдельных а.о. в энергию связывания.

Таблица 11. Аминокислотные последовательности Tk-hefu и его производных, полученных при помощи моделирования, и их активность против Kv-каналов.

Пептид	Последовательности и аминокислотные замены <sup>a</sup>							Активность			
								Kv1.1	Kv1.2	Kv1.3	Kv1.6
Предыдущие исследования <sup>b</sup>											
	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>20</b>	<b>25</b>	<b>28</b>				
Tk-hefu <sup>6</sup>	-----E-----							<sup>s</sup>	40000/8.3 <sup>3</sup>	32400±2600 <sup>u</sup>	40000/7.3
Tk-hefu-2 <sup>6</sup>	<b>ADDRCYRMCQRYHDRREKKQCKKGCRYG</b>							-	-	2000±100	-
Tk-hefu-3	-----M-----							-	-	-	-
Tk-hefu-4	-----E-----							-	-	11100±2800	-
Первый раунд											
	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>20</b>	<b>25</b>	<b>28</b>				
Tk-hefu-5 <sup>2</sup>	-K-----							-	10000/12±3	2700±300	-
Tk-hefu-6 <sup>2</sup>	--K-----							-	-	700±100	-
Tk-hefu-2_v1 <sup>o</sup>	--K-----K-----										
Tk-hefu-2_v2 <sup>o</sup>	-K-----K-----										
Tk-hefu-2_v3 <sup>o</sup>	-KK-----K-----										
Tk-hefu-2_v4 <sup>o</sup>	-KK-----										
Tk-hefu-2_v5 <sup>o</sup>	-----K-----										
Tk-hefu-2_v6 <sup>o</sup>	-----R-----										
Tk-hefu-2_v7 <sup>o</sup>	-----H-----										
Tk-hefu-2_v8 <sup>o</sup>	-----Q-----										
Tk-hefu-2_v9 <sup>o</sup>	-----W-----										
Второй раунд: компьютерное моделирование											
	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>20</b>	<b>25</b>	<b>28</b>				
Tk-hefu-6_v1 <sup>o</sup>	--K-----Q-----										
Tk-hefu-6_v2 <sup>o</sup>	--R-----R-----										
Tk-hefu-6_v3 <sup>o</sup>	--K-----K-----Y-----										
Tk-hefu-6_v4 <sup>o</sup>	--K--KQ-----										
Tk-hefu-6_v5 <sup>o</sup>	-QK-----Q--Q-----										
Tk-hefu-6_v6 <sup>o</sup>	-QKQ--Q--Q--Q--Q-----										
Tk-hefu-6_v7 <sup>o</sup>	<b>SNRQ</b> -----										
Tk-hefu-6_v8 <sup>o</sup>	<b>SNRQ-KQ--Q--Q--Q-----</b>										
Tk-hefu-6_v9 <sup>o</sup>	-QKQ-KQ--Q--Q--Q-----										

Tk-hefu-6_v10 <sup>o</sup>	--K-----RR-----								
Tk-hefu-6_v11 <sup>o</sup>	SNKQ-----								
Второй раунд: экспериментальные данные									
	1	5	10	15	20	25	28		
Tk-hefu-7 <sup>e</sup>	-QK-----							-	-
Tk-hefu-8 <sup>e</sup>	-QK-----RR-----							-	5000/40
Tk-hefu-9 <sup>e</sup>	-QK--KQ-----RR-----							-	5000/24
Tk-hefu-10 <sup>e</sup>	-QK--KQ-----Q--QRR-----							-	5000±2000
									700/39
									700/59
									700/62
									152.7±34.2
									5000/30

<sup>o</sup>Остатки, идентичные Tk-hefu-2, показаны чертой; нумерация остатков показана над последовательностями.

<sup>e</sup>Tk-hefu и его более активный (Tk-hefu-2), более слабый (Tk-hefu-4) и неактивный (Tk-hefu-3) аналоги были синтезированы и охарактеризованы ранее [174, 175]. <sup>b</sup>Tk-hefu и Tk-hefu-2 изучались *in silico* для сравнения расчетных параметров взаимодействия с каналом Kv1.3, а также для проверки предложенных вычислительных подходов. <sup>1</sup>Пептиды, изученные при помощи как моделирования, так электрофизиологии. <sup>2</sup>Пептиды, изученные только путем моделирования. <sup>3</sup>Пептиды, изученные только экспериментально. <sup>4</sup>Отсутствие эффекта при концентрации 20 мкМ. <sup>5</sup>А/Б означает, что лиганд в концентрации А нМ уменьшал ионный ток через каналы на Б процентов. <sup>6</sup>Значение ИК<sub>50</sub> в нМ.



Полученные профили энергии отдельных а.о. описывают взаимодействие пептидов с Kv1.3 (Рис. 26) и показывают, что большинство предложенных замен вносят благоприятный вклад (снижение значений энергии) в связывание с каналами (аналогично замене E23K, введенной ранее в Tk-hefu для получения Tk-hefu-2).

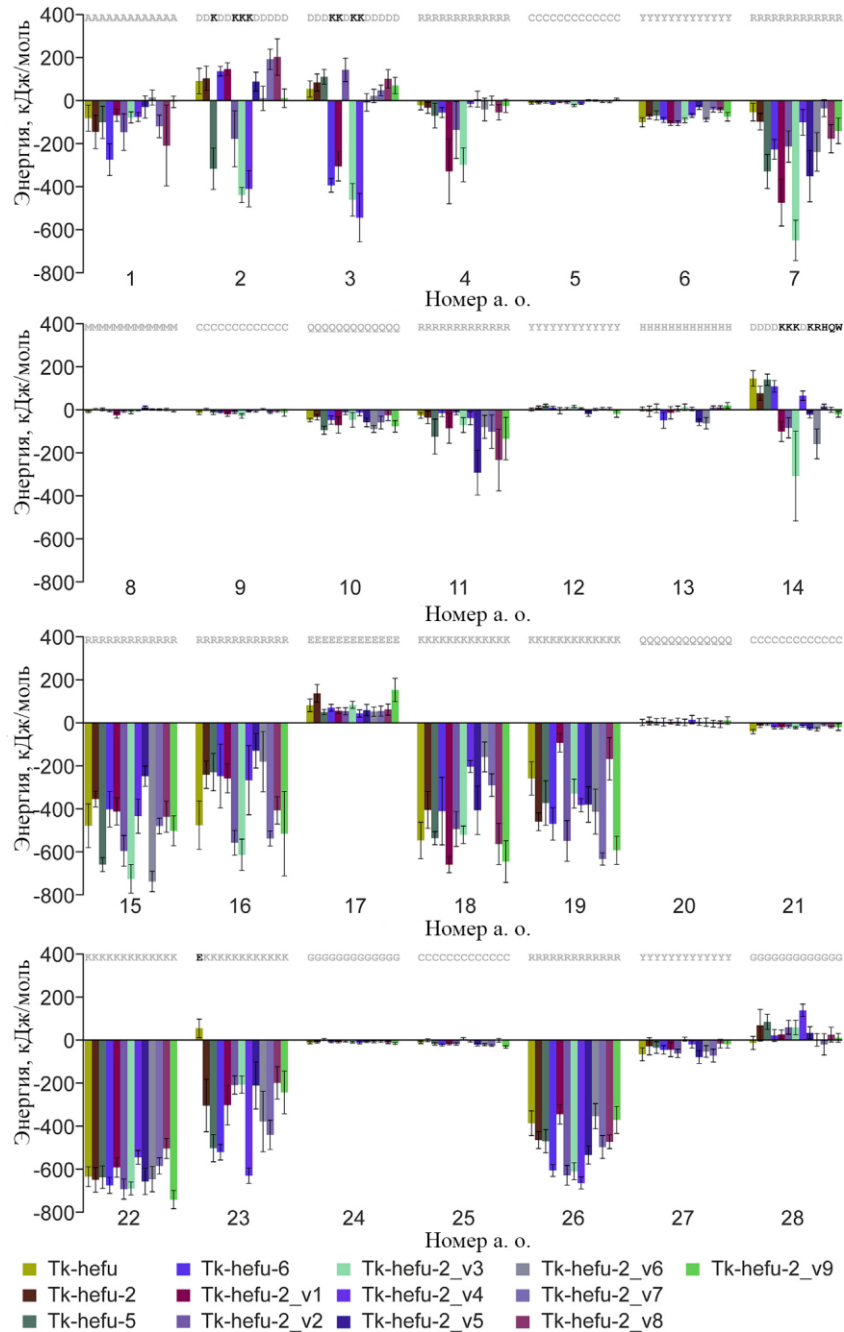


Рисунок 26. Энергетические профили взаимодействия Tk-hefu-2 и его производных в комплексе с Kv1.3. Обозначения аналогичны рисунку 20. Буквы над каждой группой столбцов обозначают аминокислотные остатки для каждого из 13 пептидов; остатки, идентичные Tk-hefu-2, показаны серым цветом.

Более отрицательный энергетический вклад предполагает повышенную аффинность связывания предлагаемого пептида с Kv1.3 (по сравнению с Tk-hefu-2). Чтобы идентифицировать а.о. канала, которые могут в наибольшей степени способствовать отталкиванию пептидов, были проанализированы расстояния между отрицательно заряженными группами канала и пептидов. Анализ межмолекулярного интерфейса комплексов при МД показал, что не каждый а.о., модифицированный в Tk-hefu-2, способен образовывать дополнительные специфические контакты (солевые мостики, водородные связи,  $\pi$ -катионные или стэкинг-взаимодействия) с Kv1.3. Так, пептиды с одиночными заменами D14K, D14R, D14H, D14Q или D14W (Tk-hefu-2\_v5–v9, Табл. 11) не образовывали дополнительных долгоживущих межмолекулярных контактов. Другие замененные остатки (D2K, D3K, а также D14K, например в Tk-hefu-2\_v3) давали несколько солевых мостиков (до двух) и водородных связей (до четырех) с каналом, что в теории должно привести к повышению аффинности.

#### *Получение производных первого раунда мутагенеза*

Для получения производных Tk-hefu-2 использовался аналогичный подход, как и в предыдущих случаях. Конечный выход пептидов составил 2 мг на 1 л бактериальной культуры. На этом этапе мы смогли получить Tk-hefu-5 и 6, тогда как Tk-hefu-2\_v1–v3, по-видимому, не могут сформировать правильную конформацию; на хроматограммах наблюдались множественные широкие пики, содержащие компоненты с одинаковой молекулярной массой. Вероятно, вносимые изменения (а именно аминокислотная замена D14K) локально «перегружают» структуру избыточным положительным зарядом, препятствуя формированию вторичной структуры и не давая полипептидной цепи принимать правильную укладку.

#### *Электрофизиологическое исследование*

Полученные Tk-hefu-5 и 6 были протестированы против Kv1.3. Значения ИК<sub>50</sub> составляли  $2,7 \pm 0,3$  мкМ для Tk-hefu-5 и  $0,7 \pm 0,1$  мкМ для Tk-hefu-6, тогда как ИК<sub>50</sub> для «родительского» пептида Tk-hefu-2 составляла  $2,3 \pm 0,4$  мкМ ( $n \geq 3$ ). Вычислительный анализ показывает, что боковая цепь K3 в Tk-hefu-6 образует один солевой мостик и две водородные связи с остатками Kv1.3 D433 и D449 (Рис. 27), тогда как D3 в Tk-hefu-2 не образует эти связи, тем самым можно объяснить более высокую активность Tk-hefu-6. На основании

этих результатов Tk-hefu-6 был выбран в качестве отправной точки для дальнейшего повышения аффинности к Kv1.3.

*Второй раунд мутагенеза: результаты вычислений*

С одной стороны, целенаправленное введение в пептид положительно заряженных а.о. может повысить его аффинность связывания с Kv1.3, а с другой стороны, локальная «перегрузка» пептида положительными зарядами может привести к неправильной укладке. Учитывая это, дальнейшее повышение аффинности требует модификации стратегии молекулярного дизайна Tk-hefu-6 (наиболее успешного искусственного пептида из первого раунда) для того, 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 пептидов от избыточных положительных зарядов (по результатам, полученным для поверхности контакта Tk-hefu-6–Kv1.3 и энергетических профилей); 3) увеличить количество водородных связей без изменения заряда (а именно за счет замен К на R). Мы получили 11 новых пептидов (Табл. 11, Tk-hefu-6\_v1–v11) и смоделировали влияние соответствующих замен.

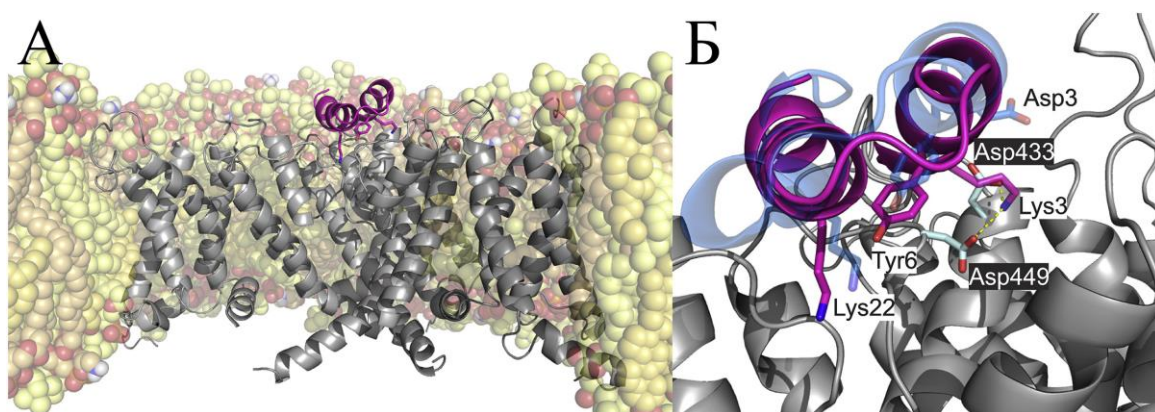


Рисунок 27. Модель структуры комплекса Tk-hefu-6—Kv1.3. (А) Общая структура комплекса после 100 нс МД внутри гидратированной липидной двухслойной мембраны. Обозначения аналогичны рисунку 11. (Б) Крупный план Tk-hefu-6 из (А), наложенный на Tk-hefu-2 для сравнения (полупрозрачный синий). Показаны D433 и D449 канала (бледно-голубые стержни), а также D3 Tk-hefu-2 (полупрозрачные голубые стержни). Водородные связи показаны пунктирными желтыми линиями. Липиды опущены для ясности.

Чтобы оценить влияние аминокислотных замен на взаимодействие пептидов с Kv1.3, мы провели вычисления, аналогичные процедурам, описанным выше. Энергетические профили пептидов, образующих комплекс с Kv1.3 (Рис. 28), показали, что замена отрицательно заряженных а.о. любыми другими значительно уменьшала неблагоприятный вклад в энергию взаимодействия, тогда как замена положительно заряженных а.о. на нейтральные приводила к противоположному результату.

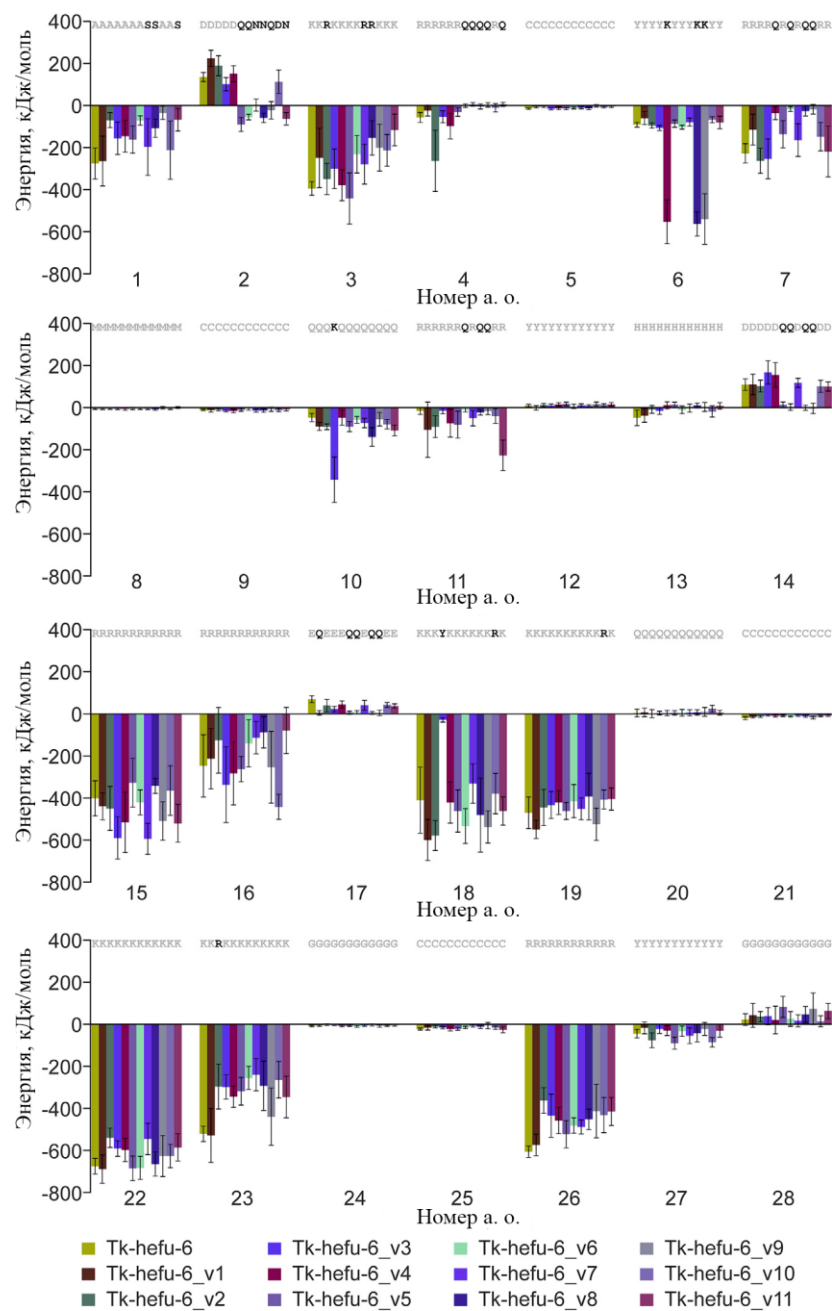


Рисунок 28. Энергетические профили взаимодействия Tk-hefu-6 и его аналогов «второго раунда» в комплексе с Kv1.3. Обозначения аналогичны рисунку 20.

Многие из предложенных замен позволили сформировать дополнительные специфические межмолекулярные контакты по сравнению с комплексом Tk-hefu-6—K<sub>v</sub>1.3. Замены К на R в различных положениях 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 появлялся дополнительный 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.

### *Второй раунд модификаций: результаты экспериментов*

Анализ замен в структуре Tk-hefu-6 выявил те, которые, вероятно, приведут к усилению связывания (Рис. 28). Несколько таких замен по отдельности или в сочетании с другими дали пептиды, названные Tk-hefu-7–10 (Табл. 11). Все процедуры для получения производных второго раунда были такими же, как и для первого раунда. На рисунке 29 показаны основные этапы получения пептидов на примере Tk-hefu-10. Выход составил ~ 2 мг с 1 л бактериальной культуры.

Рекомбинантные пептиды были охарактеризованы с помощью спектроскопии КД, чтобы убедиться, что их  $\alpha$ -спиральная структура сохраняется, несмотря на замены. В таблице 12 представлено содержание элементов вторичной структуры пептидов по сравнению с исходным пептидом Tk-AMP-X2 из пшеницы. По-видимому, мутантные пептиды Tk-hefu сохраняют  $\alpha$ -спиральную конформацию, характерную для  $\alpha$ -гарпининовой укладки.

Рекомбинантные пептиды Tk-hefu-7–10 тестировали на каналах K<sub>v</sub>1.3 в концентрации 0,7 мкМ для сравнения их активности с «родительским» пептидом Tk-hefu-6 из первого раунда модификаций (его ИК<sub>50</sub>  $\approx$  0,7 мкМ). Производные второго раунда блокировали K<sub>v</sub>1.3-опосредованные токи на  $\approx$  39, 59, 62 и 69% соответственно. Для проверки селективности Tk-hefu-10, наиболее активного производного, его активность измеряли на каналах K<sub>v</sub>1.2 и K<sub>v</sub>1.6. В концентрации 5 мкМ токи через K<sub>v</sub>1.2 и K<sub>v</sub>1.6 блокировались на 50 и 30% соответственно (Рис. 30).

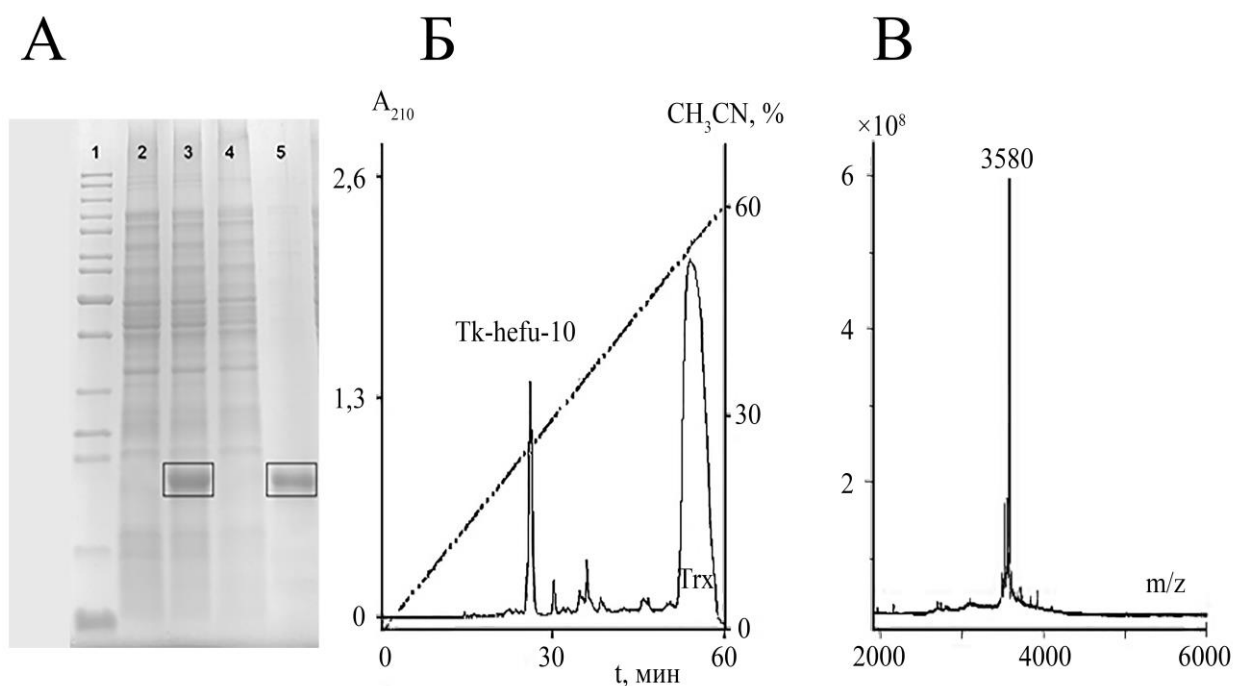


Рисунок 29. Получение рекомбинантных производных Tk-hefu-2 на примере Tk-hefu-10. (А) Электрофоретический анализ полученных образцов при экспрессии гена Тгх-Tk-hefu-10 и очистке Tk-hefu-10. На дорожку 1 наносили маркеры молекулярной массы; 2 — общий клеточный белок до индукции ИПТГ; 3 — общий клеточный белок после индукции; 4 — белки, не связавшиеся с кобальтовой смолой; 5 — очищенный гибридный белок. (Б) Профиль разделения гибридного белка Тгх-Tk-hefu-10, расщепленного легкой цепью энтеропептидазы человека, методом ОФ-ВЭЖХ. (В) МАЛДИ МС спектр очищенного Tk-hefu-10. Расчетная моноизотопная масса  $[M+H]^+$  составляет 3580 Да, экспериментально измеренная — тоже 3580 Да.

Таблица 12. Содержание элементов вторичной структуры в Tk-AMP-X2 и его производных по данным спектроскопии КД.

Название	$\alpha$ -Спираль, %	$\beta$ -Слой, %	$\beta$ -Поворот, %	Неупорядоченная, %	NRMSD
Tk-AMP-X2	42,5	7,2	18,6	31,7	0,01
Tk-hefu-2	35,4	13,6	20,8	30,2	0,02
Tk-hefu-6	35,8	12,5	20,9	30,8	0,02
Tk-hefu-10	29,7	14,2	22,7	33,4	0,02

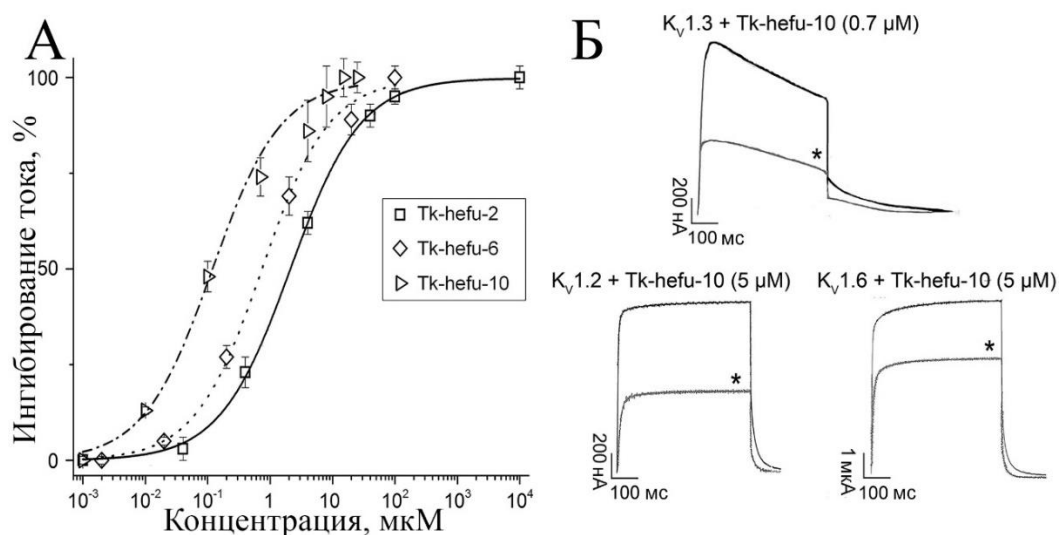


Рисунок 30. Активность производных Tk-hefu-2 на  $K_v$ -каналах. (А) Кривые зависимости ингибирования тока ионов через каналы  $K_v1.3$  от концентрации пептидов для Tk-hefu-2, 6 и 10. Усы показывают стандартную ошибку среднего ( $n \geq 3$ ). (Б) Активность Tk-hefu-10 на каналах  $K_v1.2$ , 1.3 и 1.6, экспрессированных в ооцитах лягушки *X. laevis*. Показаны записи токов через соответствующие каналы в контроле и после добавления пептида (отмечены звездочкой) в указанных концентрациях.

И $K_{50}$  для  $K_v1.3$  составила  $152,7 \pm 34,2$  нМ, что соответствует 4,6 и 15,1-кратному увеличению аффинности по сравнению с Tk-hefu-6 и Tk-hefu-2 соответственно (Рис. 30; Табл. 11). Tk-hefu-10 сохраняет высокую селективность Tk-hefu-2; значение И $K_{50}$  для  $K_v1.3$  в 33 раза ниже, чем для ближайшего по аффинности канала  $K_v1.2$ . Чтобы проверить, какие именно замены в Tk-hefu-6 привели к увеличению сродства, которое мы наблюдаем в пептиде Tk-hefu-10, мы смоделировали комплекс Tk-hefu-10 с  $K_v1.3$  и подвергли его 110 нс МД. Моделирование и последующий вычислительный анализ аналогичны процедурам, описанным выше. Как и ожидалось, остаток Q2 образует дополнительную водородную связь с остатком H451 (Рис. 26). K3 образует те же контакты, что и в комплексе Tk-hefu-6— $K_v1.3$ , и дополнительно образует  $\pi$ -катионное взаимодействие с H451. Замена Y6K привела к дополнительному солевому мостику и  $\pi$ -катионному взаимодействию, но вызвала потерю одного стэкинг-контакта. Замены K18R и K19R привели к двум дополнительным стэкинг-взаимодействиям.

### 3.3.2 Получение и изучение пептида Tk-hefu-11

Среди полученных в предыдущей главе 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 Tk-hefu-8 к 9 увеличения аффинности почти не наблюдается. В связи с этим мы решили сохранить лишь те а.о., которые приводили к значительному увеличению аффинности по отношению к каналу  $K_V1.3$  (Табл. 11). Таким образом на основе предыдущих экспериментов был предложен новый пептид, названный Tk-hefu-11.

### Получение Tk-hefu-11

Tk-hefu-11 был получен в бактериальной системе экспрессии аналогично предыдущим пептидам (Рис. 31). Конечный выход Tk-hefu-11 составил ~6 мг на 1 л бактериальной культуры.

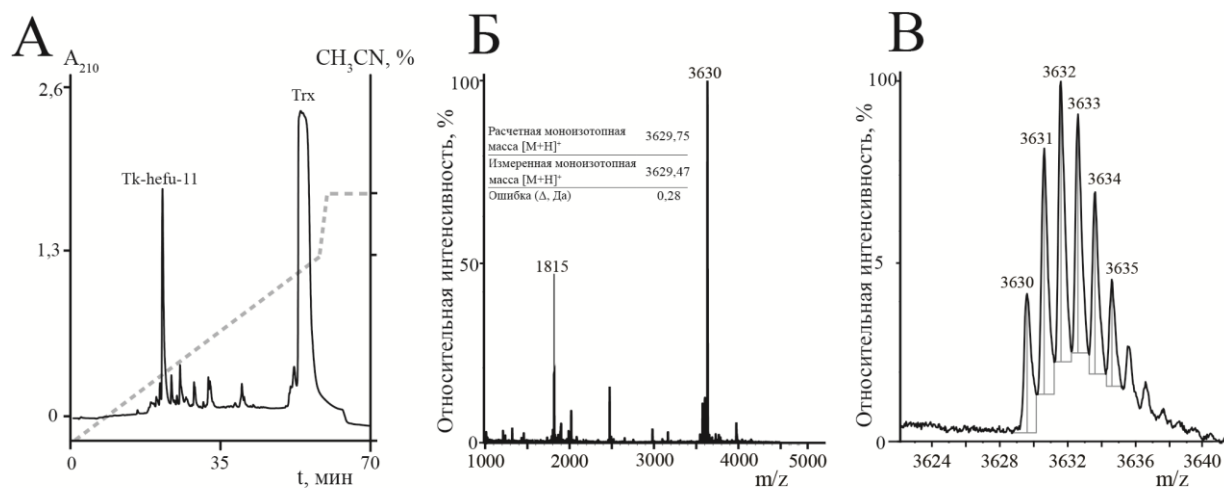


Рисунок 31. (А) Выделение рекомбинантного пептида Tk-hefu-11 после гидролиза гибридного белка Trx-Tk-hefu-11 легкой цепью энтеропептидазы человека. (Б) МАЛДИ масс-спектр очищенного пептида Tk-hefu-11. (В) Увеличенная область спектра. Измеренная моноизотопная молекулярная масса  $[M+H]^+$  составила 3629,47 Да, рассчитанное значение составило 3629,75 Да.



*Активность Tk-hefu-11*

Tk-hefu-11 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 ЭК<sub>50</sub>, которые для K<sub>v</sub>1.3 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<sub>v</sub>1.1 на  $41,2 \pm 2,9\%$  и K<sub>v</sub>1.2 на  $50,1 \pm 0,8\%$  ( $n \geq 3$ ). Эти данные указывают на более сильное ингибирование канала K<sub>v</sub>1.6 по сравнению с другими протестированными изоформами K<sub>v</sub>-каналов, что делает Tk-hefu-11 уникальным пептидом, обладающим способностью ингибировать K<sub>v</sub>1.6 в наномолярном диапазоне и коэффициентом селективности  $>8$  (Рис. 32А–Г и Табл. 14).

Чтобы определить, ингибирует ли Tk-hefu-11 каналы K<sub>v</sub>1 как поровый блокатор или взаимодействует с ПЧД, мы использовали два подхода. Первый подход заключался в том, что Tk-hefu-11 тестировали на мутантах K<sub>v</sub>1.3; конструкции hK<sub>v</sub>1.3-mut1–3 описаны в разделе, посвященном изучению токсина MeKTx11-1. Значительные различия в блокирующей активности Tk-hefu-11 наблюдались для всех конструкций (Рис. 32Д–З), что позволяет предположить, что пептид взаимодействует с порой канала. Следует отметить, что mut3 содержит небольшой фрагмент mut1 (Рис. 15) только с двумя заменами. Немного более высокий уровень ингибирования Tk-hefu-11 для mut3 по сравнению с K<sub>v</sub>1.3 дикого типа свидетельствует о том, что эти замены хоть и незначительно, но влияют на связывание. Напротив, сильное снижение ингибирующего эффекта, наблюдаемое для mut1, указывает на важность D423, R424 или S429 для взаимодействия пептида с K<sub>v</sub>1.3 по сравнению с соответствующими остатками в K<sub>v</sub>1.2.

Второй подход заключался в том, что мы оценили зависимость проводимости от потенциала для канала K<sub>v</sub>1.6 (Рис. 32И). Достоверной разницы в значениях  $V_{1/2}$  не наблюдалось:  $7,7 \pm 0,8$  мВ и  $12,9 \pm 0,9$  мВ в контроле и в присутствии 10 нМ Tk-hefu-11 соответственно. Если бы пептид действовал на ПЧД, мы бы ожидали увидеть сдвиг зависимости активации от напряжения. В совокупности эти данные указывают на то, что Tk-hefu-11 взаимодействует с ПД K<sub>v</sub>-каналов.

Поскольку мы наблюдали лизис ооцитов при более высоких концентрациях Tk-hefu-11, мы решили проверить его противомикробную активность, которая является отличительной чертой цитолитических пептидов. Мы не обнаружили какой-либо активности в концентрациях до 20 мкМ ни в отношении грамположительных, ни в отношении грамотрицательных бактерий. Кроме того, пептид не проявлял гемолитической или цитолитической активности в концентрациях до 20 мкМ ( $n \geq 3$ ).

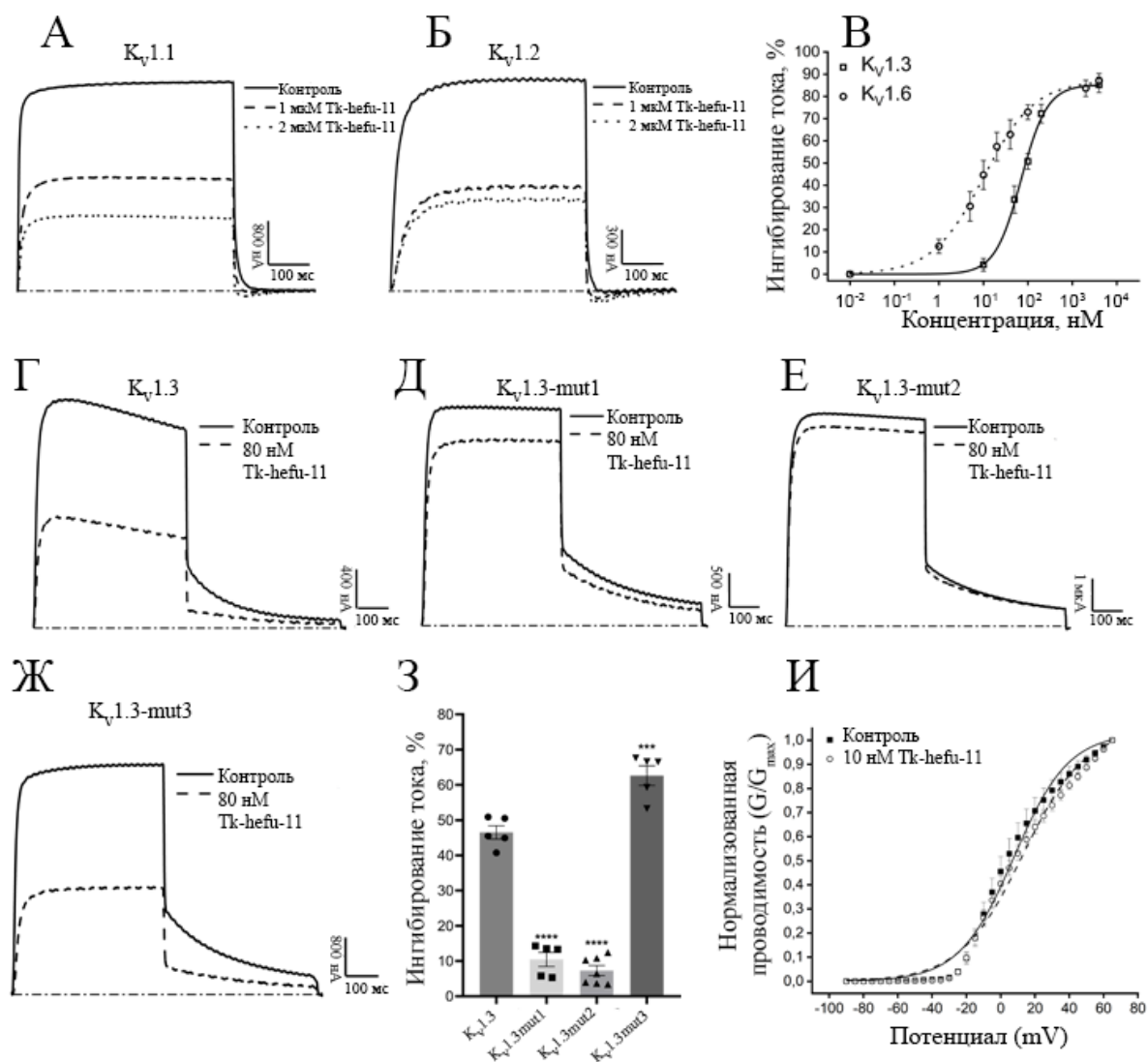


Рисунок 32. Электрофизиологический профиль Tk-hefu-11 ( $n \geq 3$ ). (А, Б) Записи токов, проходящих через каналы, экспрессированные в ооцитах *X. laevis*. Показаны записи для (А)  $K_v1.1$  и (Б)  $K_v1.2$  в контрольных условиях (сплошные линии) и после добавления пептида. Штриховые линии представляют записи тока в присутствии 1 мкМ Tk-hefu-11, пунктирные линии представляют ток в присутствии 2 мкМ Tk-hefu-11, а штрихпунктирные линии представляют нулевой уровень тока. (В) Кривые доза-ответ для Tk-hefu-11 на каналах  $K_v1.3$  и 1.6. (Г–Ж) Записи токов на каналах (Г)  $K_v1.3$ , (Д)  $K_v1.3mut1$ , (Е)  $K_v1.3mut2$  и (Ж)  $K_v1.3mut3$  в контроле (сплошные линии) и после добавления 80 нМ Tk-hefu-11 (пунктирные линии). Штрихпунктирные линии представляют нулевой уровень тока. (З) Сравнение активности Tk-hefu-11 в отношении различных каналов. Процент блока показан как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего, \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; \*\*\* $p < 0,01$ . (И) Соотношение проводимость–мембранный потенциал ( $G/G_{max}-V$ )  $K_v1.6$  в контроле (черные символы) и в присутствии 10 нМ Tk-hefu-11 (белые символы).

Таблица 14. Аминокислотные последовательности производных Tk-hefu и их активность против Kv-каналов. Серая заливка выделяет цистеины, образующие дисульфидные связи. Аминокислотные замены, введенные в Tk-AMP-X2 для получения пептидов Tk-hefu, выделены жирным шрифтом.

Название	Последовательность	K <sub>v</sub> 1.1	K <sub>v</sub> 1.2	K <sub>v</sub> 1.3	K <sub>v</sub> 1.6
κ-Hefutoxin-1	-GHACYRNCWR--EGNDEETCKERC---	-	150000	40000	-
Tk-AMP-X2	ADDR <b>C</b> ERM <b>C</b> QRYHDRREKKQ <b>C</b> MGCRYG	-	-	-	-
Tk-hefu-1	ADDR <b>C</b> Y <b>R</b> MCQRYHDRREKKQ <b>C</b> KEGCRYG	-	40000/8,3	34000±2800	40000/7,3
Tk-hefu-2	ADDR <b>C</b> Y <b>R</b> MCQRYHDRREKKQ <b>C</b> KKGCRYG	-	40000/11,7	2300±400	40000/17,4
Tk-hefu-6	AD <b>K</b> R <b>C</b> Y <b>R</b> MCQRYHDRREKKQ <b>C</b> KKGCRYG	5000/75±5	5000/69±1	700±100	5000/58±3
Tk-hefu-7	A <b>Q</b> <b>K</b> R <b>C</b> Y <b>R</b> MCQRYHDRREKKQ <b>C</b> KKGCRYG	5000/62±4	5000/48±2	700/39	5000/68±2
Tk-hefu-8	A <b>Q</b> <b>K</b> R <b>C</b> Y <b>R</b> MCQRYHDRRE <b>R</b> RQ <b>C</b> KKGCRYG	5000/72±1	5000/40	700/59	5000/50±2
Tk-hefu-9	A <b>Q</b> <b>K</b> R <b>C</b> <b>K</b> QMCQRYHDRRE <b>R</b> RQ <b>C</b> KKGCRYG	5000/79±2	5000/24	700/62	5000/51±1
Tk-hefu-10	A <b>Q</b> <b>K</b> R <b>C</b> <b>K</b> QMCQRYH <b>Q</b> RR <b>Q</b> RRQ <b>C</b> KKGCRYG	5000/54±5	5000±2000	152,7±34,2	5000/30
Tk-hefu-11	AD <b>K</b> R <b>C</b> Y <b>R</b> MCQRYH <b>Q</b> RR <b>Q</b> RRQ <b>C</b> KKGCRYG	1000/41,2±2,9	1000/50,1±0,8	70,4±2,9 <sup>1</sup>	10,0±0,5 <sup>1</sup>

<sup>1</sup>ЭК<sub>50</sub>

Условные обозначения аналогичны таблице 1.

### *Пространственная структура Tk-hefu-11*

Трехмерная структура Tk-hefu-11 была изучена в водном растворе. Для этого получили  $^{15}\text{N}$ -меченый аналог пептида ( $^{15}\text{N}$ -Tk-hefu-11), используя в качестве источника азота культуральную среду, содержащую только  $^{15}\text{N}$ . Структура пептида была изучена в лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН. Химические сдвиги и координаты депонированы в базы данных PDB и BMRB под регистрационными кодами 7QXJ и 34703 соответственно. Структура Tk-hefu-11 в растворе состоит из двух антипараллельных  $\alpha$ -спиралей (остатки K3–Q10 и R15–G24), соединенных короткой петлей (Рис. 33), соответствующих  $\alpha$ -гарпининовой укладке, которая описана для многих растительных пептидов [192]. Структура стабилизирована двумя дисульфидными мостиками (C5–C25 и C9–C21) и девятью водородными связями внутри  $\alpha$ -спиралей. Детальный анализ полученной структуры показывает, что Y6, вероятно, образует  $\pi$ -катионный контакт с K3 и/или K22. Tk-hefu-11 имеет небольшое гидрофобное ядро, образованное дисульфидными связями, окруженными M8 и Y12 с одной стороны и A1, Y6 и Y27 с другой стороны. Tk-hefu-11 также обнаруживает анизотропное распределение электростатических параметров; выраженная положительно заряженная сторона образована остатками аргинина и лизина, а незаряженная и относительно неполярная сторона образована боковыми цепями остатков цистеина, метионина и тирозина.

### *Молекулярное моделирование объясняет селективность Tk-hefu-11*

Чтобы выявить молекулярные детерминанты, которые объясняют различия в активности Tk-hefu-10 и 11 на  $K_v$ -каналах, мы провели компьютерное исследование молекулярных комплексов этих пептидов с hKv1.3 и rKv1.6 (Рис. 34). Мы воспользовались исследованной ЯМР-структурой Tk-hefu-11 и построили гомологичную модель Tk-hefu-10 на ее основе. Рассчитаны траектории МД, проведен вычислительный анализ контактных поверхностей и энергетического вклада а.о. в комплексообразование. В соответствии с результатами нашего исследования производных Tk-hefu, анализ вкладов отдельных а.о. в энергию межмолекулярного взаимодействия дал ожидаемые результаты (Рис. 35).

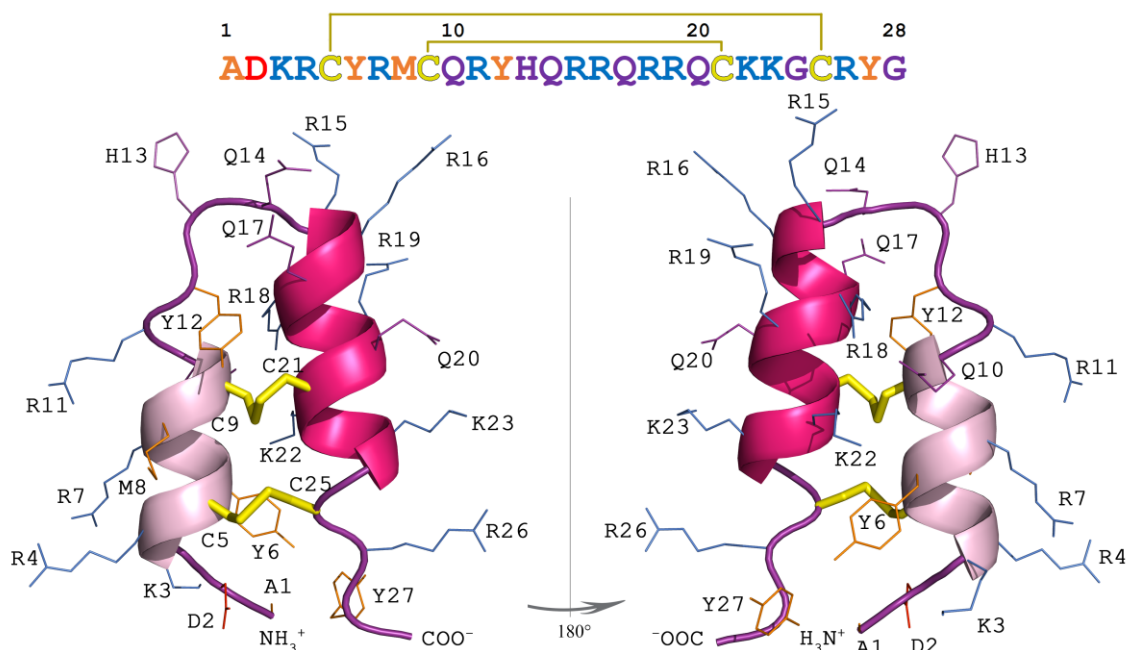


Рисунок 33. Пространственная структура Tk-hefu-11. Аминокислотная последовательность представлена выше. N-концевая  $\alpha$ -спираль показана светло-розовым, а C-концевая — розовым. Дисульфидные связи показаны желтыми стержневыми структурами; боковые цепи положительно заряженных а.о. показаны синими линиями; отрицательно заряженных, красными; ароматических и гидрофобных, оранжевыми; и гидрофильных незаряженных, фиолетовыми линиями.

При переходе от Tk-hefu-10 к 11 замена нейтрального а.о. на отрицательно заряженный (Q2D), а также замена положительно заряженного а.о. на нейтральный (K6Y) дает отрицательный вклад в связывание с каналом (увеличение значений энергии). Наоборот, замена Q7R дает положительный вклад (падение значений энергии). Эти тенденции наблюдаются в комплексах как с Kv1.3, так и с Kv1.6. Анализ траекторий МД показал, что в комплексах Tk-hefu-11-rKv1.6, Tk-hefu-10-rKv1.6 и Tk-hefu-11-hKv1.3 пептиды значительно меняют свое положение относительно исходного состояния, тогда как положение Tk-hefu-10 в комплексе с hKv1.3 меняется менее значительно (Рис. 36).

В комплексах с Kv1.6 гибкость N-конца пептидов сдерживается образованием солевого мостика и водородными связями между их N-концевой аминогруппой и карбоксильной группой боковой цепи D404 канала. Положительно заряженная боковая цепь R11 стремится приблизиться к специфичному для канала rKv1.6 отрицательно заряженному мотиву <sup>399</sup>EADDVD<sup>404</sup>, расположенному в петле S5-P (Рис. 36A). Таким образом, Tk-hefu-11 слегка

вращается вокруг оси поры Kv1.6 при МД, что приводит к образованию множества полярных контактов: R11 образует солевые мостики с E399 и D404, водородные связи с S405 и Y430 и  $\pi$ -катионный контакт с F407.

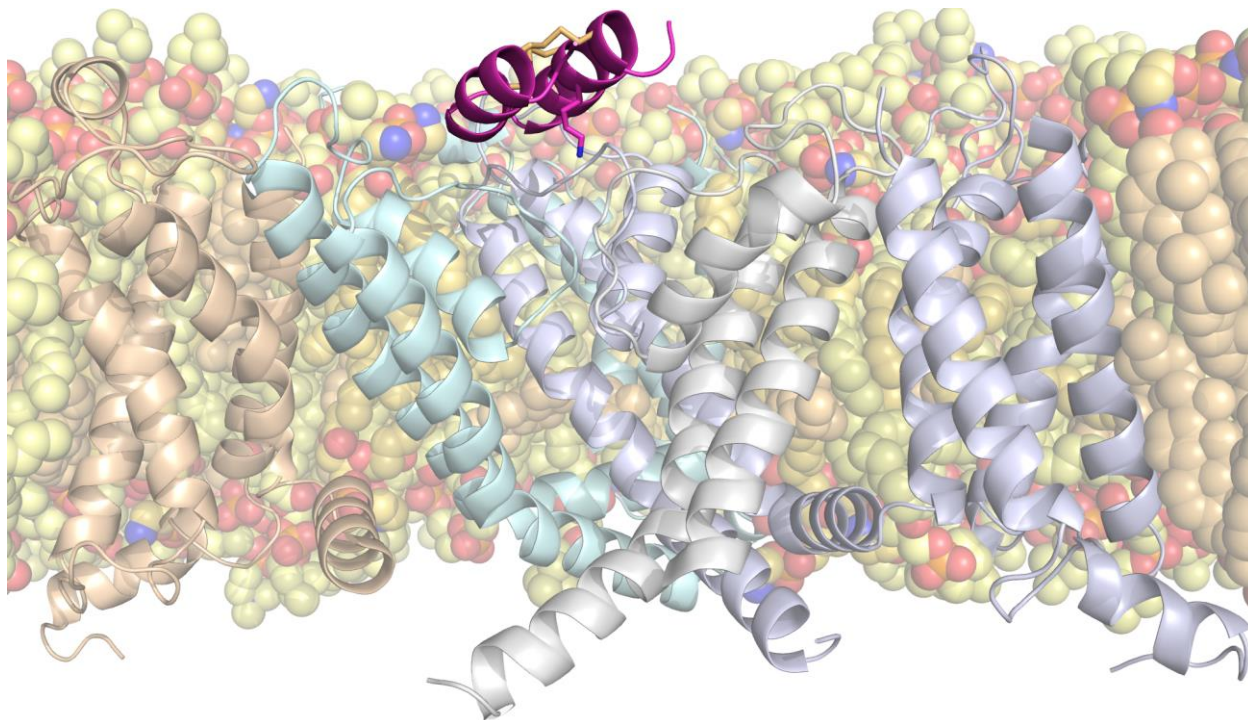


Рисунок 34. Модель комплекса между Kv1.6 и Tk-hefu-11. Структура показана после 501 нс МД внутри гидратированного липидного бислоя. Обозначения аналогичны рисунку 11. Tk-hefu-11 выделен розовым цветом; K22 (закупоривает пору канала) и дисульфидные мостики (желтые) показаны в виде стержневой модели.

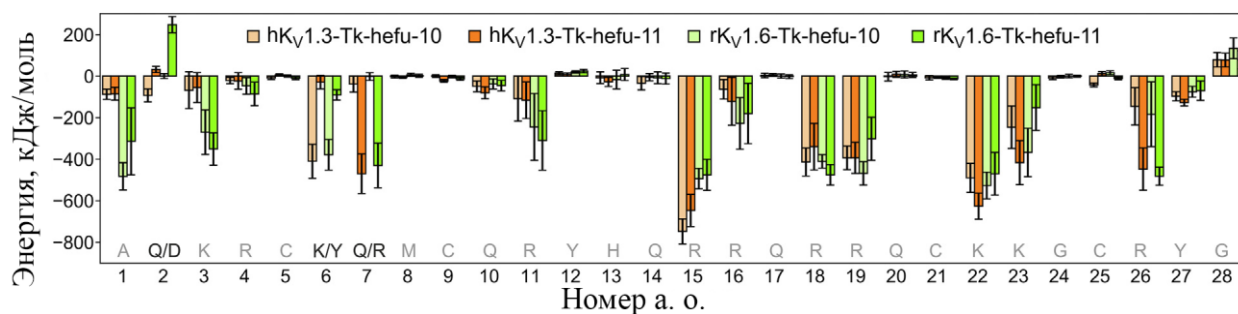


Рисунок 35. Энергетические профили взаимодействия пептидов Tk-hefu-10 и 11 с hKv1.3 и rKv1.6. Обозначения аналогичны рисунку 20.

Более того, переориентация Tk-hefu-11 позволяет R7 достичь боковых цепей D412 и D428 (и образовывать два солевых мостика), а также боковых цепей W415 и Y430 соседней субъединицы канала (и образовывать два  $\pi$ -катионных контакта), что значительно стабилизирует комплекс (Рис. 36Б). Более короткая и незаряженная боковая цепь Q7 в Tk-hefu-10 не может достичь этих а.о. канала, поэтому ее положение в комплексе менее стабилизировано, и R11 образует только один солевой мостик с D404 в Kv1.6 (Рис. 36Б). Примечательно, что в комплексе с Kv1.6 остаток D2 Tk-hefu-11 имеет тенденцию отталкиваться от D404 (Рис. 36Б). Однако, одновременно с этим остаток D2 также отталкивает С-концевую карбоксильную группу от N-конца. У Tk-hefu-11 С-конец взаимодействует с K23, образуя внутримолекулярный солевой мостик, стабилизирующий вторичную структуру пептида.

В Tk-hefu-10, имеющем Q2 вместо D2, взаимодействуют N- и С-концевые группы. Это приводит к искажению вторичной структуры пептида и сближению С-концевой карбоксильной группы с D404 Kv1.6, дестабилизируя комплекс (Рис. 36Б, В). Канал-специфичный отрицательно заряженный мотив <sup>420</sup>EADDPT<sup>425</sup> в петле S5–P hKv1.3 имеет более низкий формальный заряд по сравнению с вышеупомянутым <sup>399</sup>EADDDVD<sup>405</sup> в rKv1.6, поскольку D404 заменен на T425 в первом (Рис. 36А). Кроме того, боковая цепь T425 недостаточно длинна, чтобы достичь и зафиксировать положение N-концевого остатка описанным выше образом. Следовательно, электростатическое притяжение со стороны петли S5–P в меньшей степени влияет на положение пептида в случае Kv1.3. Tk-hefu-11 в комплексе с Kv1.3 мало перемещается при МД, а R7 образует солевой мостик с D433, водородную связь с G427 и  $\pi$ -катионный контакт с F428 (Рис. 36Г). В комплексе с Tk-hefu-10 такого сдвига не происходит, потому что Q7 не заряжен. Вместо этого он образует водородную связь с D449 соседней субъединицы канала. Вместе с двумя водородными связями, образованными Q2 с D449 и D433, это взаимодействие заставляет Tk-hefu-10 разрушать свою вторичную структуру (Рис. 36Д).

Анализ взаимодействий при МД показал, что Tk-hefu-11 в комплексах с Kv1.3 и 1.6 образует больше контактов с каналами, чем Tk-hefu-10 (Табл. 15), что согласуется с результатами электрофизиологических экспериментов. Несмотря на то, что Tk-hefu-10 участвует в образовании большего количества среднеживущих и короткоживущих контактов (19 и 11 соответственно), он формирует только 16 долгоживущих специфических взаимодействий с Kv1.6. Это указывает на то, что Tk-hefu-10 образует слабый комплекс с Kv1.6, что согласуется с нашими экспериментальными данными.

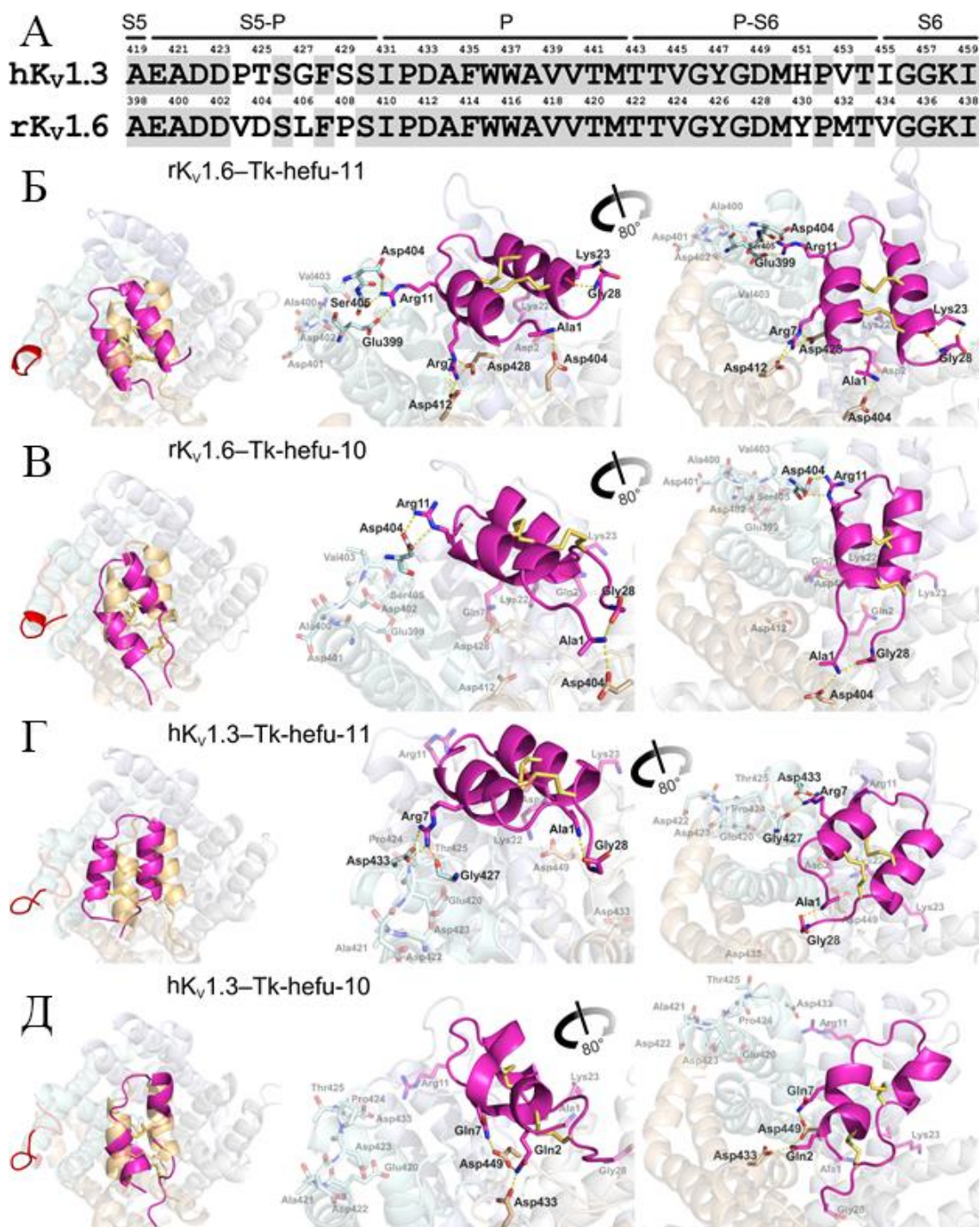


Рисунок 36. Взаимодействия Tk-hefu-10 и 11 с K<sub>V</sub>1.3 и 1.6. (А) Выравнивание аминокислотной последовательности области внешнего вестибуля поры каналов hK<sub>V</sub>1.3 и rK<sub>V</sub>1.6. Нумерация остатков показана над каждой последовательностью; идентичные остатки заштрихованы серым цветом. Над выравниванием отмечены функциональные сегменты каналов. Б–Д Ориентация пептидов в комплексах Tk-hefu-11–rK<sub>V</sub>1.6 (Б), Tk-hefu-10–rK<sub>V</sub>1.6 (В), Tk-hefu-11–hK<sub>V</sub>1.3 (Г), Tk-hefu-10–hK<sub>V</sub>1.3 (Д). (Г) и hK<sub>V</sub>1.3–Tk-hefu-10 (Д). Ориентация пептидов вестибуле поры показана в левом сегменте каждой панели.



Наш 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 Kv1.3 за счет электростатического отталкивания боковых цепей D433 и D449 (Рис. 36Г и Д). Однако ни Q2, ни D2 в Tk-hefu-10 или 11 не образуют специфических контактов с Kv1.6. С другой стороны, остаток Tk-hefu-10 K6 участвует в солевом мостике, трех водородных связях и двух  $\pi$ -катионных контактах в комплексе с Kv1.3, тогда как остаток Y6 Tk-hefu-11 образует только одну водородную связь и одно стэкинг-взаимодействие. В комплексе с Kv1.6 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 Kv1.6 и 1.3.

Совершенно неожиданно Tk-hefu-11, который был разработан для воздействия на Kv1.3, продемонстрировал выраженное сродство и селективность к Kv1.6. Наше молекулярное моделирование говорит о том, что наблюдаемая активность Tk-hefu-11 обусловлена (i) прямыми контактами между каналом и теми а.о., которые отличаются от других пептидов Tk-hefu, и (ii) косвенным эффектом замен. Установленная нами трехмерная структура Tk-hefu-11 (Рис. 33) отличается от исходной структуры Tk-hefu-1 (PDB ID: 5LM0) [175]. Основные различия заключаются в угле между  $\alpha$ -спиралями и расположении Y6. В то время как у Tk-hefu-1  $\alpha$ -спирали более образуют межспиральный угол  $\approx 160^\circ$ , Tk-hefu-11 оказался более плоским с межспиральным углом  $\approx -170^\circ$ ; т.е. произошло перекручивание  $\alpha$ -спиралей на  $30^\circ$ . Этот поворот объясняется наличием  $\pi$ -катионного взаимодействия между Y6 и K3, обнаруженным в Tk-hefu-11. С другой стороны, в Tk-hefu-1 D3 не может вступить в такой контакт, а боковая цепь Y6 поворачивается, чтобы взаимодействовать с Q10 и K18. Эти непредвиденные изменения приводят к другому способу взаимодействия пептида с каналами и должны учитываться при молекулярном моделировании.

← Специфичные для каналов мотивы <sup>399</sup>EADDVD<sup>404/420</sup>EADDPT<sup>425</sup> петли S5-P в Kv1.6/Kv1.3 показаны красным, Tk-hefu-10 и 11 показаны розовым; исходная ориентация пептидов показана песочно-желтым цветом. Взаимодействующие а.о. пептидов и каналов показаны в виде стержневой модели; а.о., не участвующие во взаимодействиях, показаны полупрозрачно. Межмолекулярные контакты (водородные связи и солевые мостики) показаны пунктирными желтыми линиями.

Таблица 15. Межмолекулярные контакты, наблюдаемые в комплексах Tk-hefu-10 и 11 с Kv1.3 и 1.6 при МД.

Контакты <sup>а</sup>	Число контактов в комплексах			
	Kv1.3		Kv1.6	
	Tk-hefu-10	Tk-hefu-11	Tk-hefu-10	Tk-hefu-11
Все специфические взаимодействия <sup>б</sup>				
Долгоживущие	20	27	16	25
Среднеживущие	9	9	19	20
Короткоживущие	16	8	11	8
Слабые	5	2	6	6
Солевые мостики				
Долгоживущие	4	7	5	6
Среднеживущие	-	-	3	6
Короткоживущие	5	2	-	-
Слабые	-	-	2	2
Водородные связи				
Долгоживущие	10	11	7	11
Среднеживущие	6	5	10	9
Короткоживущие	9	5	9	6
Слабые	3	1	3	2
Стэкинг/ $\pi$ - $\pi$ взаимодействия				
Долгоживущие	3	3	2	2
Средне-живущие	1	3	1	2
Короткоживущие	-	1	1	2
Слабые	-	1	-	-
$\pi$ -Катионные взаимодействия				
Долгоживущие	3	6	2	6
Среднеживущие	2	1	5	3
Короткоживущие	2	-	1	-
Слабые	2	-	1	2
Все неспецифические (гидрофобные) взаимодействия				
Долгоживущие	175	163	130	135
Среднеживущие	77	71	82	85
Короткоживущие	52	39	43	53
Слабые	24	18	21	31

<sup>а</sup>Время жизни каждого контакта считается частью времени траектории МД (всего 450 нс, первые 50 нс не учитывались для получения репрезентативных данных). Слабые контакты: время жизни больше 7% и меньше 10%; короткоживущие контакты: время жизни больше 10%, но меньше 20%; среднеживущие контакты: время жизни больше 20%, но меньше 50%; долгоживущие контакты: время жизни больше 50%. <sup>б</sup>Водородные связи, солевые мостики, стэкинг/ $\pi$ - $\pi$  взаимодействия и  $\pi$ -катионные взаимодействия.

## 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.

## Благодарности

Автор выражает благодарность:

Коллективам лаборатории молекулярных инструментов для нейробиологии и лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН за дружественную и располагающую к научной работе атмосферу, Кузьменкову А.И. и Опарину П.Б. за ценные методологические указания и рекомендации, Андрееву Я.А., Козлову С.А., Малеевой Е.Е., Корольковой Ю.В. и Осмакову Д.И. за научно-техническую помощь и рекомендации.

Коллективу лаборатории токсикологии и фармакологии университета г. Лёвен, Бельгия, а именно: Пеньёру С., Пиньейро-Жуниору Э.Л. и Титгату Я. — за проведение и помощь в освоении электрофизиологических экспериментов.

Коллективу лаборатории моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН и лично Ефремову Р.Г., Чугунову А.О., Табакмахеру В.М. и Крылову Н.А. за компьютерное моделирование и помощь в подборе аминокислотных замен.

Коллективу лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН и лично Феофанову А.В. и Игнатовой А.А. за проведение экспериментов с использованием спектроскопии кругового дихроизма и изучение цитолитической активности Tk-hefu-11.

Коллективу лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии и лично Лушпе В.А. и Минееву К.С. за исследование Tk-hefu-11 методами ЯМР-спектроскопии.

Коллективу лаборатории инженерии белка ИБХ РАН и лично Некрасовой О.В. за получение рекомбинантных токсинов MeKTx11-1, 3 и их мутантов.

Коллективу группы масс-спектрометрии ЦКП «Протеом человека» и лично Торопыгину И.Ю. за получение масс-спектров.

Фрадкову А.Ф. за внесение точечных замен в ген канала Kv1.3.

## Список литературы

1. *Hille B* (2001) *Ion Channels of Excitable Membranes*. 3rd ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass.
2. *Yu FH, Catterall WA* (2004) The VGL-kanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Sci STKE*. doi: 10.1126/STKE.2532004RE15
3. *González C, Baez-Nieto D, Valencia I, Oyarzún I, Rojas P, Naranjo D, Latorre R, González C, Baez-Nieto D, Valencia I, Oyarzún I, Rojas P, Naranjo D, Latorre R* (2012) K<sup>+</sup> Channels: Function-Structural Overview. *Compr Physiol*. doi: 10.1002/cphy.c110047
4. *Kubo Y, Adelman JP, Clapham DE, Jan LY, Karschin A, Kurachi Y, Lazdunski M, Nichols CG, Seino S, Vandenberg CA* (2005) International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacological reviews* 57 (4): 509–526. doi: 10.1124/pr.57.4.11.
5. *Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y* (2010) Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiological reviews* 90 (1): 291–366. doi: 10.1152/physrev.00021.2009.
6. *Plant LD, Rajan S, Goldstein SAN* (2005) K2P channels and their protein partners. *Current Opinion in Neurobiology* 15 (3 SPEC. ISS.): 326–333. doi: 10.1016/j.conb.2005.05.008.
7. *Goldstein SAN, Bayliss DA, Kim D, Lesage F, Plant LD, Rajan S* (2005) International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. *Pharmacological reviews* 57 (4): 527–40. doi: 10.1124/pr.57.4.12.
8. *Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stühmer W, Wang X* (2005) International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological reviews* 57 (4): 473–508. doi: 10.1124/pr.57.4.10.1.
9. *Köhler M, Hirschberg B, Bond CT, Kinzie JM, Marrion N V, Maylie J, Adelman JP, Köhler AM* (1996) Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science* 273 (5282): 1709–1714. doi: 10.1126/science.273.5282.1709.
10. *Wei AD, Gutman GA, Aldrich R, Chandy KG, Grissmer S, and Wulff H* (2005) International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels. *Pharmacological Reviews* 57 (4): 473–508. doi: 10.1124/pr.57.4.10.
11. *Kaczmarek LK, Aldrich RW, Chandy KG, Grissmer S, Wei AD, Wulff H* (2017) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. C. Nomenclature and Properties of Calcium-Activated and Sodium-Activated Potassium Channels. *Pharmacological reviews* 69 (1): 1–11. doi: 10.1124/PR.116.012864.

12. Long SB, Campbell EB, MacKinnon R (2005) Crystal Structure of a Mammalian Voltage-Dependent Shaker Family K<sup>+</sup> Channel. *Science* 309 (5736): 897–903. doi: 10.1126/science.1116269.
13. Grissmer S, Nguyen AN, Aiyar J, Hanson DC, Mather RJ, Gutman GA, Karmilowicz MJ, Auperin DD, Chandy KG (1994) Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K<sup>+</sup> channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Molecular pharmacology* 45 (6): 1227–34.
14. Heginbotham L, Lu Z, Abramson T, MacKinnon R (1994) Mutations in the K<sup>+</sup> channel signature sequence. *Biophysical Journal* 66 (4): 1061–1067. doi: 10.1016/S0006-3495(94)80887-2.
15. Bezanilla F, Armstrong CM (1972) Negative conductance caused by entry of sodium and cesium ions into the potassium channels of squid axons. *The Journal of general physiology* 60 (5): 588–608. doi: 10.1085/jgp.60.5.588.
16. MacKinnon R (2003) Potassium channels. *FEBS Letters* 555 (1): 62–65. doi: 10.1016/S0014-5793(03)01104-9.
17. Aggarwal SK, MacKinnon R (1996) Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K<sup>+</sup> channel. *Neuron* 16 (6): 1169–1177. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80143-9.
18. Lu Z, Klem AM, Ramu Y (2001) Ion conduction pore is conserved among potassium channels. *Nature* 413 (6858): 809–813. doi: 10.1038/35101535.
19. Lu Z, Klem AM, Ramu Y (2002) Coupling between Voltage Sensors and Activation Gate in Voltage-gated K<sup>+</sup> Channels. *The Journal of General Physiology* 120 (5): 663–676. doi: 10.1085/jgp.20028696.
20. Barros F, Domínguez P, de la Peña P (2012) Cytoplasmic domains and voltage-dependent potassium channel gating. *Front Pharmacol.* doi: 10.3389/fphar.2012.00049
21. Bezanilla F (2000) The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiological reviews* 80 (2): 555–92. doi: 10.1126/science.279.5349.403.
22. Zagotta WN, Hoshi T, Aldrich RW (1994) Shaker potassium channel gating. III: Evaluation of kinetic models for activation. *The Journal of General Physiology* 103 (2): 321–362. doi: 10.1085/jgp.103.2.321.
23. Demo SD, Yellen G (1991) The inactivation gate of the Shaker K<sup>+</sup> channel behaves like an open-channel blocker. *Neuron* 7 (5): 743–753. doi: 10.1016/0896-6273(91)90277-7.
24. Zagotta WN, Hoshi T, Aldrich RW (1990) Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science* 250 (4980): 568–71. doi: 10.1126/science.2122520.
25. Oliva C, González V, Naranjo D (2005) Slow Inactivation in Voltage Gated Potassium

- Channels Is Insensitive to the Binding of Pore Occluding Peptide Toxins. *Biophysical Journal* 89 (2): 1009–1019. doi: 10.1529/biophysj.105.060152.
26. *Choi KL, Aldrich RW, Yellen G* (1991) Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K<sup>+</sup> channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (12): 5092–5. doi: 10.1073/pnas.88.12.5092.
  27. *Heinemann SH, Rettig J, Graack HR, Pongs O* (1996) Functional characterization of Kv channel beta-subunits from rat brain. *The Journal of Physiology* 493 (Pt 3): 625–633. doi: 10.1113/jphysiol.1996.sp021409.
  28. *Long SB, Tao X, Campbell EB, MacKinnon R* (2007) Atomic structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* 2007 450:7168 450 (7168): 376–382. doi: 10.1038/nature06265.
  29. *Matthies D, Bae C, Toombes GES, Fox T, Bartesaghi A, Subramaniam S, Swartz KJ* (2018) Single-particle cryo-EM structure of a voltage-activated potassium channel in lipid nanodiscs. *Elife*. doi: 10.7554/ELIFE.37558
  30. *Banerjee A, Lee A, Campbell E, MacKinnon R* (2013) Structure of a pore-blocking toxin in complex with a eukaryotic voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Elife*. doi: 10.7554/eLife.00594
  31. *Liu S, Zhao Y, Dong H, Xiao L, Zhang Y, Yang Y, Ong ST, Chandy KG, Zhang L, Tian C* (2021) Structures of wild-type and H451N mutant human lymphocyte potassium channel KV1.3. *Cell Discovery* 2021 7:1 7 (1): 1–5. doi: 10.1038/s41421-021-00269-y.
  32. *Nguyen A, Kath JC, Hanson DC, Biggers MS, Canniff PC, Donovan CB, Mather RJ, Bruns MJ, Rauer H, Aiyar J, Lepplé-Wienhues A, Gutman GA, Grissmer S, Cahalan MD, Chandy KG* (1996) Novel nonpeptide agents potently block the C-type inactivated conformation of Kv1.3 and suppress T cell activation. *Mol. Pharmacol.* 50
  33. *Tyagi A, Ahmed T, Jian S, Bajaj S, Ong ST, Goay SSM, Zhao Y, Vorobyov I, Tian C, George Chandy K, Bhushan S* (2022) Rearrangement of a unique Kv1.3 selectivity filter conformation upon binding of a drug. *Proc Natl Acad Sci U S A*. doi: 10.1073/PNAS.2113536119/-/DCSUPPLEMENTAL
  34. *Tarcha EJ, Olsen CM, Probst P, Peckham D, Muñoz-Elías EJ, Kruger JG, Iadonato SP* (2017) Safety and pharmacodynamics of dalazatide, a Kv1.3 channel inhibitor, in the treatment of plaque psoriasis: A randomized phase 1b trial. *PLoS One*. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0180762
  35. *Selvakumar P, Fernández-Mariño AI, Khanra N, He C, Paquette AJ, Wang B, Huang R, Smider V V., Rice WJ, Swartz KJ, Meyerson JR* (2022) Structures of the T cell potassium channel Kv1.3 with immunoglobulin modulators. *Nature Communications* 2022 13:1 13

- (1): 1–12. doi: 10.1038/s41467-022-31285-5.
36. *Blackiston DJ, McLaughlin KA, Levin M* (2009) Bioelectric controls of cell proliferation: Ion channels, membrane voltage and the cell cycle. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 8 (21): 3519. doi: 10.4161/CC.8.21.9888.
  37. *Chittajallu R, Chen Y, Wang H, Yuan X, Ghiani CA, Heckman T, McBain CJ, Gallo V* (2002) Regulation of Kv1 subunit expression in oligodendrocyte progenitor cells and their role in G1/S phase progression of the cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (4): 2350. doi: 10.1073/PNAS.042698399.
  38. *Lee SC, Price M, Prystowsky MB, Deutsch C* (1988) Volume response of quiescent and interleukin 2-stimulated T-lymphocytes to hypotonicity. <https://doi.org/10.1152/ajpcell19882542C286>. doi: 10.1152/AJPCELL.1988.254.2.C286
  39. *Deutsch C, Chen LQ* (1993) Heterologous expression of specific K<sup>+</sup> channels in T lymphocytes: Functional consequences for volume regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (21): 10036–10040. doi: 10.1073/PNAS.90.21.10036.
  40. *Hebert SC, Desir G, Giebisch G, Wang W* (2005) Molecular diversity and regulation of renal potassium channels. *Physiological reviews* 85 (1): 319–371. doi: 10.1152/PHYSREV.00051.2003.
  41. *Smart SL, Lopantsev V, Zhang CL, Robbins CA, Wang H, Chiu SY, Schwartzkroin PA, Messing A, Tempel BL* (1998) Deletion of the K(V)1.1 potassium channel causes epilepsy in mice. *Neuron* 20 (4): 809–819. doi: 10.1016/S0896-6273(00)81018-1.
  42. *Herson PS, Virk M, Rustay NR, Bond CT, Crabbe JC, Adelman JP, Maylie J* (2003) A mouse model of episodic ataxia type-1. *Nature neuroscience* 6 (4): 378–383. doi: 10.1038/NN1025.
  43. *Glaudemans B, Van Der Wijst J, Scola RH, Lorenzoni PJ, Heister A, Van Der Kemp AMW, Knoers N V., Hoenderop JG, Bindels RJ* (2009) A missense mutation in the Kv1.1 voltage-gated potassium channel-encoding gene KCNA1 is linked to human autosomal dominant hypomagnesemia. *The Journal of clinical investigation* 119 (4): 936–942. doi: 10.1172/JCI36948.
  44. *Masnada S, Hedrich UBS, Gardella E et al.* (2017) Clinical spectrum and genotype–phenotype associations of KCNA2-related encephalopathies. *Brain* 140 (9): 2337–2354. doi: 10.1093/BRAIN/AWX184.
  45. *Tombola F, Pathak MM, Isacoff EY* (2005) Voltage-Sensing Arginines in a Potassium Channel Permeate and Occlude Cation-Selective Pores. *Neuron* 45 (3): 379–388. doi: 10.1016/J.NEURON.2004.12.047.



46. *Rus H, Pardo CA, Hu L, Darrah E, Cudrici C, Niculescu T, Niculescu F, Mullen KM, Allie R, Guo L, Wulff H, Beeton C, Judge SIV, Kerr DA, Knaus HG, Chandy KG, Calabresi PA* (2005) The voltage-gated potassium channel Kv1.3 is highly expressed on inflammatory infiltrates in multiple sclerosis brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (31): 11094–11099. doi: 10.1073/PNAS.0501770102.
47. *Beeton C, Wulff H, Standifer NE et al.* (2006) Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (46): 17414–17419. doi: 10.1073/PNAS.0605136103.
48. *Kundu-Raychaudhuri S, Chen YJ, Wulff H, Raychaudhuri SP* (2014) Kv1.3 in psoriatic disease: PAP-1, a small molecule inhibitor of Kv1.3 is effective in the SCID mouse psoriasis--xenograft model. *Journal of autoimmunity* 55 (1): 63–72. doi: 10.1016/J.JAUT.2014.07.003.
49. *Hyodo T, Oda T, Kikuchi Y, Higashi K, Kushiya T, Yamamoto K, Yamada M, Suzuki S, Hokari R, Kinoshita M, Seki S, Fujinaka H, Yamamoto T, Miura S, Kumagai H* (2010) Voltage-gated potassium channel Kv1.3 blocker as a potential treatment for rat anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol*. doi: 10.1152/AJPRENAL.00374.2010
50. *Nicolaou SA, Szigligeti P, Neumeier L, Molleran Lee S, Duncan HJ, Kant SK, Mongey AB, Filipovich AH, Conforti L* (2007) Altered dynamics of Kv1.3 channel compartmentalization in the immunological synapse in systemic lupus erythematosus. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 179 (1): 346–356. doi: 10.4049/JIMMUNOL.179.1.346.
51. *Li M, Jan YN, Jan LY* (1992) Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. *Science* 257 (5074): 1225–1230. doi: 10.1126/science.1519059.
52. *Xu J, Yu W, Yuh Nung Jan, Lily Yeh Jan, Li M* (1995) Assembly of Voltage-gated Potassium Channels: CONSERVED HYDROPHILIC MOTIFS DETERMINE SUBFAMILY-SPECIFIC INTERACTIONS BETWEEN THE  $\alpha$ -SUBUNITS. *Journal of Biological Chemistry* 270 (42): 24761–24768. doi: 10.1074/JBC.270.42.24761.
53. *Shamotienko OG, Parcej DN, Dolly JO* (1997) Subunit combinations defined for K<sup>+</sup> channel Kv1 subtypes in synaptic membranes from bovine brain. *Biochemistry* 36 (27): 8195–8201. doi: 10.1021/bi970237g.
54. *Dodson PD, Barker MC, Forsythe ID* (2002) Two heteromeric Kv1 potassium channels differentially regulate action potential firing. *Journal of Neuroscience* 22 (16): 6953–6961. doi: 10.1523/jneurosci.22-16-06953.2002.
55. *Tytgat J, Hess P* (1992) Evidence for cooperative interactions in potassium channel gating.

- Nature 359 (6394): 420–423. doi: 10.1038/359420A0.
56. *Tabakmakher VM, Krylov NA, Kuzmenkov AI, Efremov RG, Vassilevski AA* (2019) Kalium 2.0, a comprehensive database of polypeptide ligands of potassium channels. *Scientific Data* 2019 6:1 6 (1): 1–8. doi: 10.1038/s41597-019-0074-x.
  57. *Peigneur S, Billen B, Derua R, Waelkens E, Debaveye S, Béress L, Tytgat J* (2011) A bifunctional sea anemone peptide with Kunitz type protease and potassium channel inhibiting properties. *Biochemical pharmacology* 82 (1): 81–90. doi: 10.1016/J.BCP.2011.03.023.
  58. *Koschak A, Bugianesi RM, Mitterdorfer J, Kaczorowski GJ, Garcia ML, Knaus HG* (1998) Subunit composition of brain voltage-gated potassium channels determined by hongotoxin-1, a novel peptide derived from *Centruroides limbatus* venom. *The Journal of biological chemistry* 273 (5): 2639–2644. doi: 10.1074/JBC.273.5.2639.
  59. *Gao B, Peigneur S, Tytgat J, Zhu S* (2010) A potent potassium channel blocker from *Mesobuthus eupeus* scorpion venom. *Biochimie* 92 (12): 1847–1853. doi: 10.1016/J.BIOCHI.2010.08.003.
  60. *Kuzmenkov AI, Vassilevski AA, Kudryashova KS, Nekrasova O V., Peigneur S, Tytgat J, Feofanov A V., Kirpichnikov MP, Grishin E V.* (2015) Variability of Potassium Channel Blockers in *Mesobuthus eupeus* Scorpion Venom with Focus on Kv1.1: AN INTEGRATED TRANSCRIPTOMIC AND PROTEOMIC STUDY. *The Journal of biological chemistry* 290 (19): 12195–12209. doi: 10.1074/JBC.M115.637611.
  61. *Кузьменков АИ, Пеньёр С, Тутгат Я, Василевский АА* (2019) Фармакологическая характеристика пептидных лигандов калиевых каналов MeКТх13-2 и MeКТх13-3 из яда скорпиона *Mesobuthus eupeus*. *Российский физиологический журнал им И М Сеченова* 105 (11): 1452–1462. doi: 10.1134/S0869813919110074.
  62. *Dhawan R, Varshney A, Mathew MK, Lala AK* (2003) BTK-2, a new inhibitor of the Kv1.1 potassium channel purified from Indian scorpion *Buthus tamulus*. *FEBS Letters* 539 (1–3): 7–13. doi: 10.1016/S0014-5793(03)00125-X.
  63. *Selisko B, Garcia C, Becerril B, Gómez-Lagunas F, Garay C, Possani LD* (1998) Cobatoxins 1 and 2 from *Centruroides noxius* Hoffmann constitute a subfamily of potassium-channel-blocking scorpion toxins. *European journal of biochemistry* 254 (3): 468–479. doi: 10.1046/J.1432-1327.1998.2540468.X.
  64. *Huys I, Olamendi-Portugal T, Garcia-Gómez BI, Vandenberghe I, Van Beeumen J, Dyason K, Clynen E, Zhu S, Van Der Walt J, Possani LD, Tytgat J* (2004) A Subfamily of Acidic  $\alpha$ -K<sup>+</sup> Toxins. *Journal of Biological Chemistry* 279 (4): 2781–2789. doi: 10.1074/JBC.M311029200.

65. *Diego-García E, Abdel-Mottaleb Y, Schwartz EF, De La Vega RCR, Tytgat J, Possani LD* (2008) Cytolytic and K<sup>+</sup> channel blocking activities of beta-KTx and scorpine-like peptides purified from scorpion venoms. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65 (1): 187–200. doi: 10.1007/S00018-007-7370-X.
66. *Cotton J, Crest M, Bouet F, Alessandri N, Gola M, Forest E, Karlsson E, Castañeda O, Harvey AL, Vita C, Ménez A* (1997) A potassium-channel toxin from the sea anemone *Bunodosoma granulifera*, an inhibitor for Kv1 channels. Revision of the amino acid sequence, disulfide-bridge assignment, chemical synthesis, and biological activity. *European journal of biochemistry* 244 (1): 192–202. doi: 10.1111/J.1432-1033.1997.00192.X.
67. *Kaufenstein S, Huys I, Lamthanh H, Stöcklin R, Sotto F, Menez A, Tytgat J, Mebs D* (2003) A novel conotoxin inhibiting vertebrate voltage-sensitive potassium channels. *Toxicon* 42 (1): 43–52. doi: 10.1016/S0041-0101(03)00099-0.
68. *Tytgat J, Vandenberghe I, Ulens C, Van Beeumen J* (2001) New polypeptide components purified from mamba venom. *FEBS letters* 491 (3): 217–221. doi: 10.1016/S0014-5793(01)02201-3.
69. *Imredy JP, Chen C, MacKinnon R* (1998) A snake toxin inhibitor of inward rectifier potassium channel ROMK1. *Biochemistry* 37 (42): 14867–14874. doi: 10.1021/BI980929K.
70. *Robertson B, Owen D, Stow J, Butler C, Newland C* (1996) Novel effects of dendrotoxin homologues on subtypes of mammalian Kv1 potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *FEBS letters* 383 (1–2): 26–30. doi: 10.1016/0014-5793(96)00211-6.
71. *Luna-Ramírez K, Bartok A, Restano-Cassulini R, Quintero-Hernández V, Coronas FIV, Christensen J, Wright CE, Panyi G, Possani LD* (2014) Structure, molecular modeling, and function of the novel potassium channel blocker urotoxin isolated from the venom of the Australian scorpion *Urodacus yaschenkoi*. *Molecular pharmacology* 86 (1): 28–41. doi: 10.1124/MOL.113.090183.
72. *Wang X, Umetsu Y, Gao B, Ohki S, Zhu S* (2015) Mesomartoxin, a new K(v)1.2-selective scorpion toxin interacting with the channel selectivity filter. *Biochemical pharmacology* 93 (2): 232–239. doi: 10.1016/J.BCP.2014.12.002.
73. *Corzo G, Papp F, Varga Z, Barraza O, Espino-Solis PG, Rodríguez de la Vega RC, Gaspar R, Panyi G, Possani LD* (2008) A selective blocker of Kv1.2 and Kv1.3 potassium channels from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*. *Biochemical pharmacology* 76 (9): 1142–1154. doi: 10.1016/J.BCP.2008.08.018.
74. *Olamendi-Portugal T, Bartok A, Zamudio-Zuñiga F, Balajthy A, Becerril B, Panyi G,*

- Possani LD* (2016) Isolation, chemical and functional characterization of several new K(+)-channel blocking peptides from the venom of the scorpion *Centruroides tecomanus*. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* 115 1–12. doi: 10.1016/J.TOXICON.2016.02.017.
75. *Cerni FA, Pucca MB, Peigneur S, Cremonoz CM, Bordon KCF, Tytgat J, Arantes EC* (2014) Electrophysiological characterization of Ts6 and Ts7, K<sup>+</sup> channel toxins isolated through an improved *Tityus serrulatus* venom purification procedure. *Toxins* 6 (3): 892–913. doi: 10.3390/TOXINS6030892.
76. *Possani LD, Selisko B, Gurrola GB* (1999) Structure and function of scorpion toxins affecting K<sup>+</sup>-channels. *Perspectives in Drug Discovery and Design* 1999 15:0 15 (0): 15–40. doi: 10.1023/A:1017062613503.
77. *Papp F, Batista CVF, Varga Z, Herceg M, Román-González SA, Gaspar R, Possani LD, Panyi G* (2009) Tst26, a novel peptide blocker of Kv1.2 and Kv1.3 channels from the venom of *Tityus stigmurus*. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* 54 (4): 379–389. doi: 10.1016/J.TOXICON.2009.05.023.
78. *Fajloun Z, Carlier E, Lecomte C, Geib S, Di Luccio E, Bichet D, Mabrouk K, Rochat H, De Waard M, Sabatier JM* (2000) Chemical synthesis and characterization of Pi1, a scorpion toxin from *Pandinus imperator* active on K<sup>+</sup> channels. *European journal of biochemistry* 267 (16): 5149–5155. doi: 10.1046/J.1432-1327.2000.01577.X.
79. *Péter M, Varga Z, Panyi G, Bene L, Damjanovich S, Pieri C, Possani LD, Gáspár R* (1998) *Pandinus imperator* scorpion venom blocks voltage-gated K<sup>+</sup> channels in human lymphocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 242 (3): 621–625. doi: 10.1006/BBRC.1997.8018.
80. *Kharrat R, Mansuelle P, Sampieri F, Crest M, Oughideni R, Van Rietschoten J, Martin-Eauclaire MF, Rochat H, El Ayeb M* (1997) Maurotoxin, a four disulfide bridge toxin from *Scorpio maurus* venom: purification, structure and action on potassium channels. *FEBS letters* 406 (3): 284–290. doi: 10.1016/S0014-5793(97)00285-8.
81. *M'Barek S, Mosbah A, Sandoz G, Fajloun Z, Olamendi-Portugal T, Rochat H, Sampieri F, Guijarro JI, Mansuelle P, Delepierre M, De Waard M, Sabatier JM* (2003) Synthesis and characterization of Pi4, a scorpion toxin from *Pandinus imperator* that acts on K<sup>+</sup> channels. *European journal of biochemistry* 270 (17): 3583–3592. doi: 10.1046/J.1432-1033.2003.03743.X.
82. *Abdel-Mottaleb Y, Clynen E, Jalali A, Bosmans F, Vatanpour H, Schoofs L, Tytgat J* (2006) The first potassium channel toxin from the venom of the Iranian scorpion *Odonthobuthus doriae*. *FEBS letters* 580 (26): 6254–6258. doi: 10.1016/J.FEBSLET.2006.10.029.

83. *Mahjoubi-Boubaker B, Crest M, Khalifa R Ben, El Ayeb M, Kharrat R* (2004) Kbot1, a three disulfide bridges toxin from *Buthus occitanus tunetanus* venom highly active on both SK and Kv channels. *Peptides* 25 (4): 637–645. doi: 10.1016/j.peptides.2004.02.017.
84. *Jouirou B, Mosbah A, Visan V, Grissmer S, M'Barek S, Fajloun Z, Van Rietschoten J, Devaux C, Rochat H, Lippens G, El Ayeb M, De Waard M, Mabrouk K, Sabatier JM* (2004) Cobatoxin 1 from *Centruroides noxius* scorpion venom: chemical synthesis, three-dimensional structure in solution, pharmacology and docking on K<sup>+</sup> channels. *The Biochemical journal* 377 (Pt 1): 37–49. doi: 10.1042/BJ20030977.
85. *Dudina EE, Korolkova Y V., Bocharova NE, Koshelev SG, Egorov TA, Huys I, Tytgat J, Grishin E V.* (2001) OsK2, a new selective inhibitor of Kv1.2 potassium channels purified from the venom of the scorpion *Orthochirus scrobiculosus*. *Biochemical and biophysical research communications* 286 (5): 841–847. doi: 10.1006/BBRC.2001.5492.
86. *Cologna CT, Peigneur S, Rosa JC, Selistre-de-Araujo HS, Varanda WA, Tytgat J, Arantes EC* (2011) Purification and characterization of Ts15, the first member of a new  $\alpha$ -KTX subfamily from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* 58 (1): 54–61. doi: 10.1016/J.TOXICON.2011.05.001.
87. *Orts DJB, Peigneur S, Madio B, Cassoli JS, Montandon GG, Pimenta AMC, Bicudo JEPW, Freitas JC, Zaharenko AJ, Tytgat J* (2013) Biochemical and electrophysiological characterization of two sea anemone type 1 potassium toxins from a geographically distant population of *Bunodosoma caissarum*. *Marine Drugs* 11 (3): 655–679. doi: 10.3390/md11030655.
88. *Chen P, Dendorfer A, Finol-Urdaneta RK, Terlau H, Olivera BM* (2010) Biochemical characterization of kappaM-RIIIJ, a Kv1.2 channel blocker: evaluation of cardioprotective effects of kappaM-conotoxins. *The Journal of biological chemistry* 285 (20): 14882–14889. doi: 10.1074/JBC.M109.068486.
89. *Ferber M, Sporning A, Jeserich G, DeLaCruz R, Watkins M, Olivera BM, Terlau H* (2003) A novel conus peptide ligand for K<sup>+</sup> channels. *The Journal of biological chemistry* 278 (4): 2177–2183. doi: 10.1074/JBC.M205953200.
90. *Ferber M, Al-Sabi A, Stocker M, Olivera BM, Terlau H* (2004) Identification of a mammalian target of  $\kappa$ M-conotoxin RIIIK. *Toxicon* 43 (8): 915–921. doi: 10.1016/j.toxicon.2003.12.010.
91. *Tytgat J, Debont T, Carmeliet E, Daenens P* (1995) The alpha-dendrotoxin footprint on a mammalian potassium channel. *The Journal of biological chemistry* 270 (42): 24776–24781. doi: 10.1074/JBC.270.42.24776.

92. *Swanson R, Marshall J, Smith JS, Williams JB, Boyle MB, Folander K, Luneau CJ, Antanavage J, Oliva C, Buhrow SA, Bennet C, Stein RB, Kaczmarek LK* (1990) Cloning and expression of cDNA and genomic clones encoding three delayed rectifier potassium channels in rat brain. *Neuron* 4 (6): 929–939. doi: 10.1016/0896-6273(90)90146-7.
93. *Hurst RS, Busch AE, Kavanaugh MP, Osborne PB, North RA, Adelman JP* (1991) Identification of amino acid residues involved in dendrotoxin block of rat voltage-dependent potassium channels. *Mol. Pharmacol.* 40
94. *Hopkins WF, Demas V, Tempel BL* (1994) Both N- and C-terminal regions contribute to the assembly and functional expression of homo- and heteromultimeric voltage-gated K<sup>+</sup> channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 14 (3 Pt 1): 1385–1393. doi: 10.1523/JNEUROSCI.14-03-01385.1994.
95. *Hopkins WF, Allen ML, Houamed KM, Tempel BL* (1994) Properties of voltage-gated K<sup>+</sup> currents expressed in *Xenopus* oocytes by mKv1.1, mKv1.2 and their heteromultimers as revealed by mutagenesis of the dendrotoxin-binding site in mKv1.1. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 428 (3–4): 382–390. doi: 10.1007/BF00724522.
96. *Rashid MH, Huq R, Tanner MR, Chhabra S, Khoo KK, Estrada R, Dhawan V, Chauhan S, Pennington MW, Beeton C, Kuyucak S, Norton RS* (2014) A potent and Kv1.3-selective analogue of the scorpion toxin HsTX1 as a potential therapeutic for autoimmune diseases. *Sci Rep.* doi: 10.1038/SREP04509
97. *Imperial JS, Chen P, Sporning A, Terlau H, Daly NL, Craik DJ, Alewood PF, Olivera BM* (2008) Tyrosine-rich conopeptides affect voltage-gated K<sup>+</sup> channels. *Journal of Biological Chemistry* 283 (34): 23026–23032. doi: 10.1074/jbc.M800084200.
98. *Vennekamp J, Wulff H, Beeton C, Calabresi PA, Grissmer S, Hänsel W, Chandy KG* (2004) Kv1.3-blocking 5-phenylalkoxyporsalens: a new class of immunomodulators. *Molecular pharmacology* 65 (6): 1364–1374. doi: 10.1124/MOL.65.6.1364.
99. *Garcia ML, Garcia-Calvo M, Hidalgo P, Lee A, MacKinnon R* (1994) Purification and characterization of three inhibitors of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels from *Leiurus quinquestriatus* var. *hebraeus* venom. *Biochemistry* 33 (22): 6834–6839. doi: 10.1021/bi00188a012.
100. *Takacs Z, Toups M, Kollwe A, Johnson E, Cuello LG, Driessens G, Biancalana M, Koide A, Ponte CG, Perozo E, Gajewski TF, Suarez-Kurtz G, Koide S, Goldstein SAN* (2009) A designer ligand specific for Kv1.3 channels from a scorpion neurotoxin-based library. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (52): 22211–22216. doi: 10.1073/PNAS.0910123106.
101. *Romi-Lebrun R, Lebrun B, Martin-Eauclaire MF, Ishiguro M, Escoubas P, Wu FQ, Hisada*

- M, Pongs O, Nakajima T* (1997) Purification, characterization, and synthesis of three novel toxins from the Chinese scorpion *Buthus martensi*, which act on K<sup>+</sup> channels. *Biochemistry* 36 (44): 13473–13482. doi: 10.1021/BI971044W.
102. *Huys I, Dyason K, Waelkens E, Verdonck F, Van Zyl J, Plessis J Du, Müller GJ, Van Der Walt J, Clynen E, Schoofs L, Tytgat J* (2002) Purification, characterization and biosynthesis of parabutoxin 3, a component of *Parabuthus transvaalicus* venom. *European journal of biochemistry* 269 (7): 1854–1865. doi: 10.1046/J.1432-1033.2002.02833.X.
103. *Grissmer S, Nguyen AN, Aiyar J, Hanson DC, Mather RJ, Gutman GA, Karmilowicz MJ, Auperin DD, Chandy KG* (1994) Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K<sup>+</sup> channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol. Pharmacol.* 45
104. *Olamendi-Portugal T, Somodi S, Fernández JA, Zamudio FZ, Becerril B, Varga Z, Panyi G, Gáspár R, Possani LD* (2005) Novel alpha-KTx peptides from the venom of the scorpion *Centruroides elegans* selectively blockade Kv1.3 over IKCa1 K<sup>+</sup> channels of T cells. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 46 (4): 418–429. doi: 10.1016/J.TOXICON.2005.06.001.
105. *Kuzmenkov AI, Nekrasova O V., Kudryashova KS, Peigneur S, Tytgat J, Stepanov A V., Kirpichnikov MP, Grishin E V., Feofanov A V., Vassilevski AA* (2016) Fluorescent protein-scorpion toxin chimera is a convenient molecular tool for studies of potassium channels. *Sci Rep.* doi: 10.1038/SREP33314
106. *Han S, Yi H, Yin SJ, Chen ZY, Liu H, Cao ZJ, Wu YL, Li WX* (2008) Structural basis of a potent peptide inhibitor designed for Kv1.3 channel, a therapeutic target of autoimmune disease. *The Journal of biological chemistry* 283 (27): 19058–19065. doi: 10.1074/JBC.M802054200.
107. *Abdel-Mottaleb Y, Vandendriessche T, Clynen E, Landuyt B, Jalali A, Vatanpour H, Schoofs L, Tytgat J* (2008) OdK2, a Kv1.3 channel-selective toxin from the venom of the Iranian scorpion *Odonthobuthus doriae*. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 51 (8): 1424–1430. doi: 10.1016/J.TOXICON.2008.03.027.
108. *Abbas N, Belghazi M, Abdel-Mottaleb Y, Tytgat J, Bougis PE, Martin-Eauclaire MF* (2008) A new Kaliotoxin selective towards Kv1.3 and Kv1.2 but not Kv1.1 channels expressed in oocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 376 (3): 525–530. doi: 10.1016/J.BBRC.2008.09.033.
109. *Regaya I, Beeton C, Ferrat G, Andreotti N, Darbon H, De Waard M, Sabatier JM* (2004) Evidence for domain-specific recognition of SK and Kv channels by MTX and HsTx1 scorpion toxins. *The Journal of biological chemistry* 279 (53): 55690–55696. doi:

- 10.1074/JBC.M410055200.
110. *Lebrun B, Romi-Lebrun R, Martin-Eauclaire MF, Yasuda A, Ishiguro M, Oyama Y, Pongs O, Nakajima T* (1997) A four-disulphide-bridged toxin, with high affinity towards voltage-gated K<sup>+</sup> channels, isolated from *Heterometrus spinnifer* (Scorpionidae) venom. *The Biochemical journal* 328 ( Pt 1) (Pt 1): 321–327. doi: 10.1042/BJ3280321.
  111. *Bagdány M, Batista CVF, Valdez-Cruz NA, Somodi S, Rodriguez De La Vega RC, Licea AF, Varga Z, Gáspár R, Possani LD, Panyi G* (2005) Anurotoxin, a new scorpion toxin of the alpha-KTx 6 subfamily, is highly selective for Kv1.3 over IKCa1 ion channels of human T lymphocytes. *Molecular pharmacology* 67 (4): 1034–1044. doi: 10.1124/MOL.104.007187.
  112. *Srairi-Abid N, Shahbazzadeh D, Chatti I, Mlayah-Bellalouna S, Mejdoub H, Borchani L, Benkhalifa R, Akbari A, El Ayeb M* (2008) Hemitoxin, the first potassium channel toxin from the venom of the Iranian scorpion *Hemiscorpius lepturus*. *The FEBS journal* 275 (18): 4641–4650. doi: 10.1111/J.1742-4658.2008.06607.X.
  113. *Zhu S, Peigneur S, Gao B, Luo L, Jin D, Zhao Y, Tytgat J* (2011) Molecular diversity and functional evolution of scorpion potassium channel toxins. *Mol Cell Proteomics*. doi: 10.1074/MCP.M110.002832
  114. *Zhu L, Gao B, Luo L, Zhu S* (2012) Two dyad-free Shaker-type K<sup>+</sup> channel blockers from scorpion venom. *Toxicon* 59 (3): 402–407. doi: 10.1016/j.toxicon.2011.11.016.
  115. *Shijin Y, Hong Y, Yibao M, Zongyun C, Han S, Yingliang W, Zhijian C, Wenxin L* (2008) Characterization of a new Kv1.3 channel-specific blocker, J123, from the scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Peptides* 29 (9): 1514–1520. doi: 10.1016/J.PEPTIDES.2008.04.021.
  116. *Zou Y, Zhang F, Li Y, Wang Y, Li Y, Long Z, Shi S, Shuai L, Liu J, Di Z, Yin S* (2017) Cloning, expression and identification of KTX-Sp4, a selective Kv1.3 peptidic blocker from *Scorpiops pococki*. *Cell Biosci*. doi: 10.1186/S13578-017-0187-X
  117. *Liu J, Ma Y, Yin S, Zhao R, Fan S, Hu Y, Wu Y, Cao Z, Li W* (2009) Molecular cloning and functional identification of a new K(+) channel blocker, LmKTx10, from the scorpion *Lychas mucronatus*. *Peptides* 30 (4): 675–680. doi: 10.1016/J.PEPTIDES.2008.11.015.
  118. *Xie S, Feng J, Yu C, Li Z, Wu Y, Cao Z, Li W, He X, Xiang M, Han S* (2012) Identification of a new specific Kv1.3 channel blocker, Ctri9577, from the scorpion *Chaerilus tricostatus*. *Peptides* 36 (1): 94–99. doi: 10.1016/J.PEPTIDES.2012.04.023.
  119. *Gao B, Peigneur S, Dalziel J, Tytgat J, Zhu S* (2011) Molecular divergence of two orthologous scorpion toxins affecting potassium channels. *Comparative biochemistry and physiology Part A, Molecular & integrative physiology* 159 (3): 313–321. doi: 10.1016/J.CBPA.2011.03.027.



120. Zhang Y, Zhang F, Shi S, Liu X, Cai W, Han G, Ke C, Long S, Di Z, Yin S, Li H (2019) Immunosuppressive effects of a novel potassium channel toxin Ktx-Sp2 from *Scorpiops Pocoki*. *Cell Biosci.* doi: 10.1186/S13578-019-0364-1
121. Abdel-Mottaleb Y, Coronas F V., De Roodt AR, Possani LD, Tytgat J (2006) A novel toxin from the venom of the scorpion *Tityus trivittatus*, is the first member of a new alpha-KTX subfamily. *FEBS letters* 580 (2): 592–596. doi: 10.1016/J.FEBSLET.2005.12.073.
122. Varga Z, Gurrola-Briones G, Papp F, Rodriguez De La Vega RC, Pedraza-Alva G, Tajhya RB, Gaspar R, Cardenas L, Rosenstein Y, Beeton C, Possani LD, Panyi G (2012) Vm24, a natural immunosuppressive peptide, potently and selectively blocks Kv1.3 potassium channels of human T cells. *Molecular pharmacology* 82 (3): 372–382. doi: 10.1124/MOL.112.078006.
123. Olamendi-Portugal T, Csoti A, Jimenez-Vargas JM, Gomez-Lagunas F, Panyi G, Possani LD (2017) Pi5 and Pi6, two undescribed peptides from the venom of the scorpion *Pandinus imperator* and their effects on K<sup>+</sup>-channels. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 133 136–144. doi: 10.1016/J.TOXICON.2017.05.011.
124. Feng J, Yu C, Wang M, Li Z, Wu Y, Cao Z, Li W, He X, Han S (2013) Expression and characterization of a novel scorpine-like peptide Ev37, from the scorpion *Euscorpiops validus*. *Protein expression and purification* 88 (1): 127–133. doi: 10.1016/J.PEP.2012.12.004.
125. Chen ZY, Hu YT, Yang WS, He YW, Feng J, Wang B, Zhao RM, Ding JP, Cao ZJ, Li WX, Wu YL (2012) Hg1, novel peptide inhibitor specific for Kv1.3 channels from first scorpion Kunitz-type potassium channel toxin family. *The Journal of biological chemistry* 287 (17): 13813–13821. doi: 10.1074/JBC.M112.343996.
126. Srinivasan KN, Sivaraja V, Huys I, Sasaki T, Cheng B, Kumar TKS, Sato K, Tytgat J, Yu C, San BCC, Ranganathan S, Bowie HJ, Kini RM, Gopalakrishnakone P (2002) kappa-Hefutoxin1, a novel toxin from the scorpion *Heterometrus fulvipes* with unique structure and function. Importance of the functional diad in potassium channel selectivity. *Journal of Biological Chemistry* 277 (33): 30040–30047. doi: 10.1074/jbc.M111258200.
127. Kalman K, Pennington MW, Lanigan MD, Nguyen A, Rauer H, Mahnir V, Paschetto K, Kem WR, Grissmer S, Gutman GA, Christian EP, Cahalan MD, Norton RS, Chandy KG (1998) ShK-Dap22, a potent Kv1.3-specific immunosuppressive polypeptide. *The Journal of biological chemistry* 273 (49): 32697–32707. doi: 10.1074/JBC.273.49.32697.
128. Beeton C, Pennington MW, Norton RS (2011) Analogs of the Sea Anemone Potassium Channel Blocker ShK for the Treatment of Autoimmune Diseases. *Inflammation & allergy drug targets* 10 (5): 313. doi: 10.2174/187152811797200641.

129. *Peigneur S, Orts DJB, Prieto Da Silva AR, Oguiura N, Boni-Mitake M, De Oliveira EB, Zaharenko AJ, De Freitas JC, Tytgat J* (2012) Crotonamine pharmacology revisited: novel insights based on the inhibition of KV channels. *Molecular pharmacology* 82 (1): 90–96. doi: 10.1124/MOL.112.078188.
130. *Xiang F, Xie Z, Feng J, Yang W, Cao Z, Li W, Chen Z, Wu Y* (2015) Plectasin, first animal toxin-like fungal defensin blocking potassium channels through recognizing channel pore region. *Toxins* 7 (1): 34–42. doi: 10.3390/TOXINS7010034.
131. *ElFessi-Magouri R, Peigneur S, Othman H, Srairi-Abid N, ElAyeb M, Tytgat J, Kharrat R* (2015) Characterization of Kbot21 reveals novel side chain interactions of scorpion toxins inhibiting voltage-gated potassium channels. *PLoS ONE* 10 (9): 1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0137611.
132. *Kasheverov IE, Oparin PB, Zhmak MN, Egorova NS, Ivanov IA, Gigolaev AM, Nekrasova O V., Serebryakova M V., Kudryavtsev DS, Prokopev NA, Hoang AN, Tsetlin VI, Vassilevski AA, Utkin YN* (2019) Scorpion toxins interact with nicotinic acetylcholine receptors. *FEBS Letters* 593 (19): 2779–2789. doi: 10.1002/1873-3468.13530.
133. *Orts DJB, Peigneur S, Silva-Gonçalves LC, Arcisio-Miranda M, Bicudo JEPW, Tytgat J* (2018) AbeTx1 is a novel sea anemone toxin with a dual mechanism of action on shaker-type K<sup>+</sup> channels activation. *Mar Drugs*. doi: 10.3390/md16100360
134. *Imperial JS, Bansal PS, Alewood PF, Daly NL, Craik DJ, Sporning A, Terlau H, López-Vera E, Bandyopadhyay PK, Olivera BM* (2006) A novel conotoxin inhibitor of Kv1.6 channel and nAChR subtypes defines a new superfamily of conotoxins. *Biochemistry* 45 (27): 8331–8340. doi: 10.1021/bi060263r.
135. *Goetz MA, Hensens OD, Zink DL, Borris RP, Morales F, Tamayo-Castillo G, Slaughter RS, Felix J, Ball RG* (1998) Potent nor-triterpenoid blockers of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 from *Spachea correae*. *Tetrahedron Letters* 39 (19): 2895–2898. doi: 10.1016/S0040-4039(98)00427-4.
136. *Felix JP, Bugianesi RM, Schmalhofer WA, Borris R, Goetz MA, Hensens OD, Bao JM, Kayser F, Parsons WH, Rupprecht K, Garcia ML, Kaczorowski GJ, Slaughter RS* (1999) Identification and Biochemical Characterization of a Novel Nortriterpene Inhibitor of the Human Lymphocyte Voltage-Gated Potassium Channel, Kv1.3. *Biochemistry* 38 (16): 4922–4930. doi: 10.1021/BI982954W.
137. *Hanson DC, Nguyen A, Mather RJ, Rauer H, Koch K, Burgess LE, Rizzi JP, Donovan CB, Bruns MJ, Canniff PC, Cunningham AC, Verdries KA, Mena E, Kath JC, Gutman GA, Cahalan MD, Grissmer S, Chandy KG* (1999) UK-78,282, a novel piperidine compound that potently blocks the Kv1.3 voltage-gated potassium channel and inhibits human T cell

- activation. *British Journal of Pharmacology* 126 (8): 1707. doi: 10.1038/SJ.BJP.0702480.
138. *Quintero-Hernández V, Jiménez-Vargas JM, Gurrola GB, Valdivia HH, Possani LD* (2013) Scorpion venom components that affect ion-channels function. *Toxicon* 76 328–342. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.07.012.
139. *Diego-García E, Schwartz EF, D'Suze G, González S a R, Batista CVF, García BI, de la Vega RCR, Possani LD* (2007) Wide phylogenetic distribution of Scorpine and long-chain  $\beta$ -KTx-like peptides in scorpion venoms: Identification of “orphan” components. *Peptides* 28 (1): 31–37. doi: 10.1016/j.peptides.2006.06.012.
140. *Corona M, Gurrola GB, Merino E, Cassulini RR, Valdez-Cruz N a., García B, Ramírez-Domínguez ME, Coronas FI V, Zamudio FZ, Wanke E, Possani LD* (2002) A large number of novel Ergtoxin-like genes and ERG K<sup>+</sup>-channels blocking peptides from scorpions of the genus *Centruroides*. *FEBS Letters* 532 (1–2): 121–126. doi: 10.1016/S0014-5793(02)03652-9.
141. *Srinivasan KN, Sivaraja V, Huys I, Sasaki T, Cheng B, Kumar TKS, Sato K, Tytgat J, Yu C, San BCC, Ranganathan S, Bowie HJ, Kini RM, Gopalakrishnakone P* (2002)  $\kappa$ -Hefutoxin1, a Novel Toxin from the Scorpion *Heterometrus fulvipes* with Unique Structure and Function. *Journal of Biological Chemistry* 277 (33): 30040–30047. doi: 10.1074/jbc.M111258200.
142. *Goldstein SA, Miller C* (1993) Mechanism of charybdotoxin block of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel. *Biophysical Journal* 65 (4): 1613–1619. doi: 10.1016/S0006-3495(93)81200-1.
143. *Goldstein SAN, Pheasant DJ, Miller C* (1994) The charybdotoxin receptor of a Shaker K<sup>+</sup> channel: peptide and channel residues mediating molecular recognition. *Neuron* 12 (6): 1377–1388. doi: 10.1016/0896-6273(94)90452-9.
144. *Dauplais M, Lecoq A, Song J, Cotton J, Jamin N, Gilquin B, Roumestand C, Vita C, De Medeiros CLC, Rowan EG, Harvey AL, Ménez A* (1997) On the Convergent Evolution of Animal Toxins: CONSERVATION OF A DIAD OF FUNCTIONAL RESIDUES IN POTASSIUM CHANNEL-BLOCKING TOXINS WITH UNRELATED STRUCTURES. *Journal of Biological Chemistry* 272 (7): 4302–4309. doi: 10.1074/JBC.272.7.4302.
145. *Smith LA, Reid PF, Wang FC, Parcej DN, Schmidt JJ, Olson MA, Dolly JO* (1997) Site-directed mutagenesis of dendrotoxin K reveals amino acids critical for its interaction with neuronal K<sup>+</sup> channels. *Biochemistry* 36 (25): 7690–7696. doi: 10.1021/BI963105G.
146. *Gasparini S, Danse JM, Lecoq A, Pinkasfeld S, Zinn-Justin S, Young LC, De Medeiros CCL, Rowan EG, Harvey AL, Ménez A* (1998) Delineation of the Functional Site of  $\alpha$ -Dendrotoxin: THE FUNCTIONAL TOPOGRAPHIES OF DENDROTOXINS ARE DIFFERENT BUT SHARE A CONSERVED CORE WITH THOSE OF OTHER Kv1

- POTASSIUM CHANNEL-BLOCKING TOXINS. *Journal of Biological Chemistry* 273 (39): 25393–25403. doi: 10.1074/JBC.273.39.25393.
147. *Castle NA, London DO, Creech C, Fajloun Z, Stocker JW, Sabatier JM* (2003) Maurotoxin: a potent inhibitor of intermediate conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channels. *Molecular pharmacology* 63 (2): 409–418. doi: 10.1124/MOL.63.2.409.
  148. *Batista CVF, Gómez-Lagunas F, Rodríguez De La Vega RC, Hajdu P, Panyi G, Gáspár R, Possani LD* (2002) Two novel toxins from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* that block Kv1.3 and Shaker B K<sup>+</sup>-channels with distinctly different affinities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1601 (2): 123–131. doi: 10.1016/S1570-9639(02)00458-2.
  149. *Mouhat S, Mosbah A, Visan V, Wulff H, Delepierre M, Darbon H, Grissmer S, De Waard M, Sabatier JM* (2004) The “functional” dyad of scorpion toxin Pi1 is not itself a prerequisite for toxin binding to the voltage-gated Kv1.2 potassium channels. *The Biochemical journal* 377 (Pt 1): 25–36. doi: 10.1042/BJ20030115.
  150. *Giangiacomo KM, Becker J, Garsky C, Felix JP, Priest BT, Schmalhofer W, Garcia ML, Mullmann TJ* (2007) Revealing the molecular determinants of neurotoxin specificity for calcium-activated versus voltage-dependent potassium channels. *Biochemistry* 46 (18): 5358–5364. doi: 10.1021/BI700150T.
  151. *Martínez F, Muñoz-Garay C, Gurrola G, Darszon A, Possani LD, Becerril B* (1998) Site directed mutants of Noxiustoxin reveal specific interactions with potassium channels. *FEBS letters* 429 (3): 381–384. doi: 10.1016/S0014-5793(98)00636-X.
  152. *Aiyar J, Withka JM, Rizzi JP, Singleton DH, Andrews GC, Lin W, Boyd J, Hanson DC, Simon M, Dethlefs B, Lee C lin, Hall JE, Gutman GA, George Chandy K* (1995) Topology of the pore-region of a K<sup>+</sup> channel revealed by the NMR-derived structures of scorpion toxins. *Neuron* 15 (5): 1169–1181. doi: 10.1016/0896-6273(95)90104-3.
  153. *Taylor RH, Acland DP, Attenborough S, Cammue BP, Evans IJ, Osborn RW, Ray JA, Rees SB, Broekaert WF* (1997) A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *The Journal of biological chemistry* 272 (39): 24480–7.
  154. *Tavares LS, Santos M de O, Viccini LF, Moreira JS, Miller RNG, Franco OL* (2008) Biotechnological potential of antimicrobial peptides from flowers. *Peptides* 29 (10): 1842–51. doi: 10.1016/j.peptides.2008.06.003.
  155. *Padovan L, Scocchi M, Tossi A* (2010) Structural aspects of plant antimicrobial peptides. *Current protein & peptide science* 11 (3): 210–9.
  156. *da Rocha Pitta MG, da Rocha Pitta MG, Galdino SL* (2010) Development of novel

- therapeutic drugs in humans from plant antimicrobial peptides. *Current protein & peptide science* 11 (3): 236–47.
157. *Jenssen H, Hamill P, Hancock REW* (2006) Peptide antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* 19 (3): 491–511. doi: 10.1128/CMR.00056-05.
  158. *Sang Y, Blecha F* (2008) Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases* 9 (2): 227–35. doi: 10.1017/S1466252308001497.
  159. *Rahnamaeian M* (2011) Antimicrobial peptides: modes of mechanism, modulation of defense responses. *Plant signaling & behavior* 6 (9): 1325–32.
  160. *Dimarcq JL, Bulet P, Hetru C, Hoffmann J* (1998) Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. *Biopolymers - Peptide Science Section* 47 (6): 465–477. doi: 10.1002/(SICI)1097-0282(1998)47:6<465::AID-BIP5>3.0.CO;2-#.
  161. *Takeuchi K, Takahashi H, Sugai M, Iwai H, Kohno T, Sekimizu K, Natori S, Shimada I* (2004) Channel-forming membrane permeabilization by an antibacterial protein, sapeцин. Determination of membrane-buried and oligomerization surfaces by NMR. *Journal of Biological Chemistry* 279 (6): 4981–4987. doi: 10.1074/jbc.M307815200.
  162. *Zhu S, Gao B, Tytgat J* (2005) Phylogenetic distribution, functional epitopes and evolution of the CS $\alpha$  superfamily. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62 (19–20): 2257–69. doi: 10.1007/s00018-005-5200-6.
  163. *Zhu S, Darbon H, Dyason K, Verdonck F, Tytgat J* (2003) Evolutionary origin of inhibitor cystine knot peptides. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17 (12): 1765–1767. doi: 10.1096/fj.02-1044fje.
  164. *Torres AM, Kuchel PW* (2004) The  $\beta$ -defensin-fold family of polypeptides. *Toxicon* 44 (6): 581–588. doi: 10.1016/j.toxicon.2004.07.011.
  165. *Yount NY, Kupferwasser D, Spisni A, Dutz SM, Ramjan ZH, Sharma S, Waring AJ, Yeaman MR* (2009) Selective reciprocity in antimicrobial activity versus cytotoxicity of hBD-2 and crotamine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (35): 14972–7. doi: 10.1073/pnas.0904465106.
  166. *Froy O, Gurevitz M* (1998) Membrane potential modulators: a thread of scarlet from plants to humans. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 12 (15): 1793–1796.
  167. *Cornet B, Bonmatin JM, Hetru C, Hoffmann JA, Ptak M, Vovelle F* (1995) Refined three-dimensional solution structure of insect defensin A. *Structure* 3 (5): 435–448. doi: 10.1016/S0969-2126(01)00177-0.

168. Čerovský V, Slaninová J, Fučík V, Monincová L, Bednářová L, Maloň P, Štokrová J (2011) Lucifensin, a Novel Insect Defensin of Medicinal Maggots: Synthesis and Structural Study. *ChemBioChem* 12 (9): 1352–1361. doi: 10.1002/cbic.201100066.
169. Landon C, Barbault F, Legrain M, Guenneugues M, Vovelle F (2008) Rational design of peptides active against the gram positive bacteria *Staphylococcus aureus*. *Proteins: Structure, Function and Genetics* 72 (1): 229–239. doi: 10.1002/prot.21912.
170. Zhu S, Peigneur S, Gao B, Umetsu Y, Ohki S, Tytgat J (2014) Experimental conversion of a defensin into a neurotoxin: Implications for origin of toxic function. *Molecular Biology and Evolution* 31 (3): 546–559. doi: 10.1093/molbev/msu038.
171. MacKinnon R, Cohen SL, Kuo a, Lee a, Chait BT (1998) Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels. *Science (New York, NY)* 280 (5360): 106–109. doi: 10.1126/science.280.5360.106.
172. Utkina LL, Andreev YA, Rogozhin EA, Korostyleva T V, Slavokhotova AA, Oparin PB, Vassilevski AA, Grishin E V, Egorov TA, Odintsova TI (2013) Genes encoding 4-Cys antimicrobial peptides in wheat *Triticum kiharae* Dorof. et Migush.: multimodular structural organization, intraspecific variability, distribution and role in defence. *The FEBS journal* 280 (15): 3594–608. doi: 10.1111/febs.12349.
173. Mouhat S, De Waard M, Sabatier JM (2005) Contribution of the functional dyad of animal toxins acting on voltage-gated Kv1-type channels. *Journal of Peptide Science* 11 (2): 65–68. doi: 10.1002/psc.630.
174. Berkut AA, Usmanova DR, Peigneur S et al. (2014) Structural similarity between defense peptide from wheat and scorpion neurotoxin permits rational functional design. *Journal of Biological Chemistry* 289 (20): 14331–14340. doi: 10.1074/jbc.M113.530477.
175. Berkut AAA, Chugunov AAO, Mineev KSKS, Peigneur S, Tabakmakher VMVM, Krylov NANA, Oparin PBPB, Lihonosova AFAF, Novikova EVE V., Arseniev ASAS, Grishin EVEV, Tytgat J, Efremov RGRG, Vassilevski AAAA (2019) Protein surface topography as a tool to enhance the selective activity of a potassium channel blocker. *Journal of Biological Chemistry* 294 (48): 18349–18359. doi: 10.1074/jbc.RA119.010494.
176. Kuipers BJH, Gruppen H (2007) Prediction of molar extinction coefficients of proteins and peptides using UV absorption of the constituent amino acids at 214 nm to enable quantitative reverse phase high-performance liquid chromatography-mass spectrometry analysis. *Journal of agricultural and food chemistry* 55 (14): 5445–5451. doi: 10.1021/JF070337L.
177. Provencher SW, Glöckner J (1981) Estimation of Globular Protein Secondary Structure from Circular Dichroism. *Biochemistry* 20 (1): 33–37. doi:

- 10.1021/BI00504A006/ASSET/BI00504A006.FP.PNG\_V03.
178. *Kozlov SA, Vassilevski AA, Feofanov A V., Surovoy AY, Karpunin D V., Grishin E V.* (2006) Latarcins, antimicrobial and cytolytic peptides from the venom of the spider *Lachesana tarabaevi* (Zodariidae) that exemplify biomolecular diversity. *Journal of Biological Chemistry* 281 (30): 20983–20992. doi: 10.1074/jbc.M602168200.
  179. *Vorontsova O V., Egorova NS, Arseniev AS, Feofanov A V.* (2011) Haemolytic and cytotoxic action of latarcin Ltc2a. *Biochimie* 93 (2): 227–241. doi: 10.1016/J.BIOCHI.2010.09.016.
  180. *Efremenko A V., Ignatova AA, Grin MA, Sivaev IB, Mironov AF, Bregadze VI, Feofanov A V.* (2014) Chlorin e6 fused with a cobalt-bis(dicarbollide) nanoparticle provides efficient boron delivery and photoinduced cytotoxicity in cancer cells. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 13 (1): 92–102. doi: 10.1039/C3PP50226K.
  181. *Webb B, Sali A* (2016) Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics* 2016 5.6.1-5.6.37. doi: 10.1002/cpbi.3.
  182. *Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML* (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys.* doi: 10.1063/1.445869
  183. *Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, Lindah E* (2015) Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX.* doi: 10.1016/j.softx.2015.06.001
  184. *Lindorff-Larsen K, Piana S, Palmo K, Maragakis P, Klepeis JL, Dror RO, Shaw DE* (2010) Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins Struct Funct Bioinforma.* doi: 10.1002/prot.22711
  185. *Berendsen HJC, Postma JPM, Van Gunsteren WF, Dinola A, Haak JR* (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys.* doi: 10.1063/1.448118
  186. *Bussi G, Donadio D, Parrinello M* (2007) Canonical sampling through velocity rescaling. *J Chem Phys.* doi: 10.1063/1.2408420
  187. *Pyrkov T V., Efremov RG* (2007) A fragment-based scoring function to re-rank ATP docking results. *Int J Mol Sci.* doi: 10.3390/i8111083
  188. *Pyrkov T V., Chugunov AO, Krylov NA, Nolde DE, Efremov RG* (2009) PLATINUM: A web tool for analysis of hydrophobic/hydrophilic organization of biomolecular complexes. *Bioinformatics* 25 (9): 1201–1202. doi: 10.1093/bioinformatics/btp111.
  189. *Renisio J-G, Gine Romi-Lebrun R, Blanc E, Bornet O, Nakajima T, Darbon H* Solution Structure of BmKTX, a K Blocker Toxin From the Chinese Scorpion *Buthus Martensi*. doi: 10.1002/(SICI)1097-0134(20000101)38:1

190. *Naranjo D, Miller C* (1996) A strongly interacting pair of residues on the contact surface of charybdotoxin and a Shaker K<sup>+</sup> channel. *Neuron* 16 (1): 123–130. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80029-X.
191. *Kumari R, Kumar R, Lynn A* (2014) G-mmpbsa -A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. *Journal of Chemical Information and Modeling* 54 (7): 1951–1962. doi: 10.1021/CI500020M/SUPPL\_FILE/CI500020M\_SI\_001.PDF.
192. *Oparin PB, Mineev KS, Dunaevsky YE, Arseniev AS, Belozersky MA, Grishin E V., Egorov TA, Vassilevski AA* (2012) Buckwheat trypsin inhibitor with helical hairpin structure belongs to a new family of plant defence peptides. *The Biochemical journal* 446 (1): 69–77. doi: 10.1042/BJ20120548.



## Приложение 1

Контакты <sup>a</sup>	Число контактов в комплексах					
	K <sub>v</sub> 1.1		K <sub>v</sub> 1.2		K <sub>v</sub> 1.3	
	MeKTx13-3	MeKTx13-3_RMRH	MeKTx13-3	MeKTx13-3_RMRH	MeKTx13-3	MeKTx13-3_RMRH
	Все специфические взаимодействия <sup>b</sup>					
Долгоживущие	7	17	9	9	15	17
Среднеживущие	21	23	10	17	11	4
Короткоживущие	4	5	3	3	4	2
Всего	32	45 (10)	22	29 (8)	30	23 (3)
	Солевые мостики					
Долгоживущие	1	5	1	2	4	5
Среднеживущие	3	2	2	2	2	-
Короткоживущие	-	-	-	1	1	-
Всего	4	7 (1)	3	5 (0)	7	5 (0)
	Водородные связи					
Долгоживущие	5	8	8	7	8	10
Среднеживущие	10	14	8	14	7	3
Короткоживущие	2	3	3	2	3	2
Всего	17	25 (7)	19	23 (8)	18	15 (3)
	Стэкинг/ $\pi$ - $\pi$ взаимодействия					
Долгоживущие	-	5	-	-	2	-
Средне-живущие	3	2	-	-	1	1
Короткоживущие	1	-	-	-	-	-
Всего	4	7 (1)	-	-	3	1
	$\pi$ -Катионные взаимодействия					
Долгоживущие	1	2	-	-	1	2
Среднеживущие	5	5	-	1	1	-
Короткоживущие	1	1	-	-	-	-
Всего	7	8	-	1	2	0
	Все неспецифические (гидрофобные) взаимодействия					
Долгоживущие	154	188	162	169	149	168

Среднеживущие	92	86	68	113	94	66
Короткоживущие	18	10	9	25	20	11
Всего	264	284	239	307	263	245

<sup>a</sup>Время жизни каждого контакта считается частью времени траектории МД (всего 450 нс, первые 50 нс не учитывались для получения репрезентативных данных). Слабые контакты: время жизни больше 7% и меньше 10%; короткоживущие контакты: время жизни больше 10%, но меньше 20%; среднеживущие контакты: время жизни больше 20%, но меньше 50%; долгоживущие контакты: время жизни больше 50%. <sup>b</sup>Водородные связи, солевые мостики, стэкинг/ $\pi$ - $\pi$  взаимодействия и  $\pi$ -катионного взаимодействия.