

Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

На правах рукописи

Кузьменков Алексей Игоревич

«Токсины яда скорпионов *Mesobuthus eupeus* и *Orthochirus scrobiculosus*, действующие на калиевые каналы»

Специальность – 02.00.10 – Биоорганическая химия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
кандидат химических наук
А.А. Василевский

Москва – 2016

*Работа посвящается преподавателям
Брянского городского лицея № 1 им. А.С. Пушкина:
О.А. Сосновской и А.М. Геращенко*

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	7
ВВЕДЕНИЕ	9
ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ РАБОТЫ	10
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
3.1 Суперсемейство K^+ каналов	11
3.1.1 K^+ каналы входящего выпрямления (K_{ir})	13
3.1.2 K^+ каналы, имеющие два поровых участка (K_{2P})	15
3.1.3 Потенциал-зависимые K^+ каналы (K_v)	16
3.1.3.1 Доменная организация K_v каналов	16
3.1.3.2 Механизм работы K_v каналов.....	18
3.1.3.3 Классификация K_v каналов.....	19
3.1.3.3.1 K_v каналы задержанного выпрямления	20
3.1.3.3.2 K_v каналы А-типа.....	22
3.1.3.3.3 EAG каналы.....	22
3.1.3.3.4 «Модификаторы».....	23
3.1.4 Ca^{2+} -Активируемые K^+ каналы малой и средней проводимости (SK_{Ca} , IK_{Ca})....	23
3.1.5 Ca^{2+} -Активируемые K^+ каналы большой проводимости (BK_{Ca}).....	24
3.1.6 Вспомогательные субъединицы K^+ каналов	26
3.2 Лиганды K^+ каналов	27
3.2.1 Небольшие органические молекулы.....	28
3.2.2 Полипептидные токсины	33
3.2.2.1 Змеи.....	35
3.2.2.2 Морские анемоны	36
3.2.2.3 Конусы	38
3.2.2.4 Пчелы.....	40
3.2.2.5 Пауки.....	41
3.2.2.6 Скорпионы.....	43
3.2.2.6.1 Структурные особенности блокаторов K^+ каналов из яда скорпионов.....	44
3.2.2.6.2 Многообразие блокаторов K^+ каналов из яда скорпионов.....	49
3.2.2.6.3 Взаимодействие КТх с K^+ каналами	49

3.3	Практическое применение полипептидных лигандов K⁺ каналов.....	55
3.3.1	Применение радио- и флуоресцентно-меченых аналогов токсинов	55
3.3.2	K ⁺ каналы как мишень при различных патологиях	56
3.4	Заключение	59
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....		60
5.1	Материалы.....	60
5.1.1	Реактивы	60
5.1.2	Растворы	61
5.1.3	Биологический материал.....	63
5.1.4	Культуры клеток	63
5.1.5	Лабораторные животные	63
5.1.6	Оборудование.....	63
5.1.7	Расходные материалы	64
5.1.8	Программное обеспечение.....	64
5.2	Методы.....	65
5.2.1	Разработка программного обеспечения	65
5.2.2	Конструирование и анализ библиотеки кДНК	66
5.2.3	Эксклюзионная хроматография	67
5.2.4	Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография	67
5.2.5	Масс-спектрометрия.....	67
5.2.6	Определение концентрации полипептидов. УФ-спектрофотометрия.....	68
5.2.7	Восстановление дисульфидных связей и алкилирование тиольных групп	69
5.2.8	Отщепление N-концевого остатка пироглутаминовой кислоты	69
5.2.9	Определение N-концевой аминокислотной последовательности.....	69
5.2.10	Селективный гидролиз полипептидов по остаткам глутаминовой кислоты	70
5.2.11	Синтез гена, кодирующего химерный белок eGFP-OSK1, методом ПЦР	70
5.2.12	Осаждение и очистка ДНК	72
5.2.13	Рестрикция линейных фрагментов ДНК и плазмиды pET-28a	72
5.2.14	Электрофорез ДНК в агарозном геле	72
5.2.15	Лигирование линейных фрагментов ДНК и плазмиды pET-28a	72
5.2.16	Трансформация <i>E. coli</i> методом электропорации.....	72
5.2.17	Отбор трансформантов с интересующей последовательностью ДНК.....	73
5.2.18	Выделение плазмидной ДНК.....	73

5.2.19	Секвенирование ДНК	73
5.2.20	Контролируемая экспрессия гена гибридного белка	73
5.2.21	Выделение растворимой фракции белков <i>E. coli</i>	74
5.2.22	Аффинная хроматография	74
5.2.23	Электрофорез белков в полиакриламидном геле	74
5.2.24	Приготовление сферопластов с гибридными KcsA-K _v каналами.....	74
5.2.25	Электрофизиологические исследования	75
5.2.26	Получение клеток НЕК293Т, временно экспрессирующих hK _v 1.3.....	76
5.2.27	Приготовление срезов мозжечка крысы и гистохимическое окрашивание	76
5.2.28	Микроскопия.....	77
5.2.29	Приготовление лимфоцитов для фенотипического анализа	77
5.2.30	Проточная цитометрия.....	78
5.2.31	Молекулярное моделирование	78
РЕЗУЛЬТАТЫ		79
6.1	Создание специализированной базы данных КТх – Kalium.....	79
6.1.1	Сбор данных и разработка интерфейса	79
6.1.2	Структура и особенности базы данных Kalium.....	81
6.2	Тестирование яда паукообразных на предмет наличия поровых блокаторов K⁺ каналов.....	84
6.3	Анализ транскриптома ядовитых желез скорпионов <i>M. eupreus</i> и <i>O. scrobiculosus</i>	85
6.3.1	Составление библиотек кДНК из ядовитых желез <i>M. eupreus</i> и <i>O. scrobiculosus</i>	85
6.3.2	Классификация предполагаемых токсинов и их сравнение с известными КТх	86
6.4	Выделение и характеристика блокаторов K⁺ каналов из цельных ядов скорпионов.....	92
6.4.1	Выделение новых КТх из яда <i>M. eupreus</i> с помощью хроматографических методов	92
6.4.2	Анализ хроматографического профиля яда <i>M. eupreus</i> и секвенирование активных компонентов.....	93
6.4.3	Выделение КТх из яда <i>O. scrobiculosus</i> с помощью хроматографических методов	95
6.4.4	Анализ хроматографических профилей яда <i>O. scrobiculosus</i> и идентификация КТх	97
6.4.5	Физиологическая характеристика новых токсинов	98
6.4.6	Классификация новых КТх, выделенных из яда <i>M. eupreus</i> и <i>O. scrobiculosus</i> ...	99

6.5	Создание нового биомолекулярного инструмента на основе КТх для визуализации K^+ каналов	101
6.5.1	Дизайн химерного флуоресцентного белка eGFP-OSK1	101
6.5.2	Получение рекомбинантного eGFP-OSK1	103
6.5.3	Физиологическая характеристика eGFP-OSK1	106
6.5.4	Использование eGFP-OSK1 в скрининговых технологиях	108
6.5.5	Использование eGFP-OSK1 для визуализации $hK_v1.3$, временно экспрессированных в клетках НЕК293Т	109
6.5.6	Применение eGFP-OSK1 для локализации K^+ каналов на срезах мозжечка крысы	109
6.5.7	Визуализация K^+ каналов с помощью eGFP-OSK1 на поверхности Т-лимфоцитов мыши.....	111
	ОБСУЖДЕНИЕ	113
7.1	Актуализация современной классификации КТх	113
7.2	Яд скорпионов как источник блокаторов K^+ каналов	113
7.3	Стратегии поиска и идентификации КТх	114
7.3.1	Использование регулярных выражений для анализа транскриптомных библиотек	114
7.3.2.	Идентификация КТх с помощью флуоресцентной системы в комбинации с многостадийной хроматографией	116
7.3.3	Разнообразие КТх в яде <i>M. eurus</i> и <i>O. scrobiculosus</i>	117
7.4	eGFP-OSK1 – прототип новых биомолекулярных инструментов на основе полипептидных токсинов	118
7.4.1	Роль токсинов в изучении ионных каналов	118
7.4.2	Области применения нового биомолекулярного инструмента.....	121
	ВЫВОДЫ	124
	БЛАГОДАРНОСТИ	125
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	127

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- 4-АП – 4-аминопиридин;
- БСА – бычий сывороточный альбумин;
- ДСН – додецилсульфат натрия;
- ДТТ – 1,4-дитиотреитол;
- ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид;
- МАЛДИ – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация;
- ОФ-ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография;
- ПААГ – полиакриламидный гель;
- ПЧД – потенциал-чувствительный домен;
- Трис – 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диол;
- ТФУ – трифторуксусная кислота;
- ТЭА – тетраэтиламмоний;
- ФИФ₂ – фосфатидил 4,5-дифосфат;
- ЦНС – центральная нервная система;
- ЭДТА – этилендиаминтетраацетат натрия;
- ВК_{Ca} – Ca²⁺-активируемые K⁺ каналы большой проводимости;
- Ca²⁺ каналы – кальциевые каналы;
- CS α / α – цистеин-стабилизированные спираль-петля-спираль;
- CS α / β – цистеин-стабилизированные α -спираль и β -слой;
- DAPI – 4',6-амидино-2-фенилиндол дигидрохлорид;
- EC₅₀ – полумаксимальная эффективная концентрация;
- FBS – эмбриональная телячья сыворотка;
- GPCR – G-белок-сопряженные рецепторы;
- NEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота;
- His-Tag – гексагистидиновая метка;
- ICK – цистиновый узел;
- IC₅₀ – концентрации полуингибирования;
- ИК_{Ca} – Ca²⁺-активируемые K⁺ каналы средней проводимости;
- K⁺ каналы – калиевые каналы;
- K_{ir} – K⁺ каналы входящего выпрямления;
- K_{2P} – K⁺ каналы с двумя поровыми участками;
- K_v – потенциал-чувствительные K⁺ каналы;
- K_{ap} – кажущаяся константа диссоциации;
- K_d – константа диссоциации;

K_i – константа ингибирования;

КТх – полипептиды из яда скорпионов, блокирующие K^+ каналы;

MES – 2-(*N*-морфолино)-этансульфоновая кислота;

Na^+ каналы – натриевые каналы;

P-петля – поровая петля;

PMA – форбол-12-миристан-13-ацетат;

SK_{Ca} – Ca^{2+} -активируемые K^+ каналы малой проводимости;

ТМ – трансмембранный.

ВВЕДЕНИЕ

Калиевые (K^+) каналы – суперсемейство интегральных мембранных белков, обеспечивающих селективный пассивный транспорт ионов K^+ через клеточную мембрану. K^+ каналы встречаются у всех живых организмов – от бактерий до высших многоклеточных животных, включая человека. Основные функции K^+ каналов состоят в поддержании мембранного потенциала (покоя), а также в формировании потенциала действия в электровозбудимых клетках. Сложно переоценить значение этих белков во многих физиологических процессах, включая обеспечение ионного транспорта, нервную передачу, клеточную коммуникацию и пролиферацию, гуморальную регуляцию и иммунный ответ. Поэтому изучение строения, механизмов работы и модуляции K^+ каналов – одна из важнейших задач современной биоорганической химии. Кроме того, многими работами подтверждена вовлеченность этих белков в различные патологические процессы, что делает их перспективной мишенью фармакологического поиска.

Традиционно изучение K^+ каналов тесно сопряжено с исследованием лигандов этих мембранных белков и дальнейшим использованием их как инструмента для изучения аспектов работы каналов, а также идентификации новых представителей суперсемейства. По механизму действия все лиганды K^+ каналов делятся на поровые блокаторы и модуляторы. Представители первой группы «затыкают» пору канала, подобно пробке в бутылке, а лиганды из второй группы изменяют работу канала без непосредственного физического препятствования току ионов. Пожалуй, главным источником лигандов K^+ каналов выступают яды скорпионов – сложные смеси десятков и даже сотен компонентов, как правило, коротких полипептидов. Интересно, что широкое разнообразие известных в настоящее время лигандов K^+ каналов из яда скорпионов представлено исключительно поровыми блокаторами.

По данным UniProt известно порядка 250 блокаторов K^+ каналов из яда скорпионов (КТх), что составляет всего лишь 0,5% от предполагаемого природного разнообразия этих соединений. Интенсивные исследования позволяют, с одной стороны, расширить наши представления о структурных и функциональных особенностях K^+ каналов, а с другой – найти высокоселективные вещества, которые могут быть использованы для создания лекарственных препаратов.

ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ РАБОТЫ

Цель данной работы – изучение фундаментальных и прикладных аспектов разнообразия токсинов, выделенных из яда скорпионов *M. eurus* и *O. scrobiculosus* и воздействующих на K^+ каналы. В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

- 1) Создание специализированной базы данных КТх;
- 2) Поиск и идентификация КТх в яде скорпионов *M. eurus* и *O. scrobiculosus* с помощью комбинации транскриптомных и протеомных подходов;
- 3) Анализ многообразия КТх в яде *M. eurus* и *O. scrobiculosus*, тестирование активности новых токсинов;
- 4) Создание нового биомолекулярного инструмента для изучения K^+ каналов на основе КТх.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

3.1 Суперсемейство K^+ каналов

K^+ каналы присутствуют у всех живых организмов, а у человека обнаружено 78 генов, кодирующих главные (α -) субъединицы (см. ниже) этих трансмембранных белков. В настоящее время считается, что K^+ каналы появились приблизительно с момента зарождения жизни на Земле, в пользу чего свидетельствует обнаружение более 200 канал-подобных белков у архей и бактерий, родственных K^+ каналам эукариот (1).

K^+ каналы состоят из α - и β -субъединиц: первые, являясь главными, определяют структуру и основные функции канала, а вторые влияют на кинетику его работы. В структурно-функциональном отношении все K^+ каналы млекопитающих можно разделить на пять классов, основываясь на строении α -субъединиц (**Рисунок 1**):

- 1) K^+ каналы входящего выпрямления (K_{ir}) представляют собой гомо- и гетеротетрамеры, каждая субъединица которых состоит из двух трансмембранных (ТМ) сегментов с поровым участком (Р) между ними. Работа этих каналов модулируется нуклеотидами (АТФ, АДФ), фосфорилированием, G-белками и фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфатом. У человека K_{ir} каналы кодируются 15 различными генами (2, 3).
- 2) K^+ каналы, имеющие два поровых участка (K_{2P}), построены из четырех ТМ сегментов, а при формировании канала α -субъединицы димеризуются. Эти каналы регулируются широким спектром факторов: рН, температурой, натяжением клеточной мембраны. У человека обнаружено 15 генов K_{2P} каналов (4, 5).
- 3) α -Субъединицы потенциал-зависимых (или потенциал-чувствительных) K^+ каналов (K_v) состоят из шести ТМ сегментов (S1-S6) с одним поровым участком (Р) между S5 и S6. Зрелый канал формирует тетрамер α -субъединиц. Важной особенностью K_v каналов является наличие потенциал-чувствительного домена (ПЧД), состоящего из четырех ТМ сегментов (S1-S4). S4 содержит регулярно расположенные положительно заряженные аминокислотные остатки и выполняет роль сенсора потенциала. Это самая обширная группа K^+ каналов: у человека обнаружено 40 генов (6).
- 4) Ca^{2+} -Активируемые K^+ каналы малой (SK_{Ca}) и средней (IK_{Ca}) проводимости построены из субъединиц, имеющих шесть ТМ сегментов с поровым участком между S5 и S6, как и в случае K_v каналов. Однако сегмент S4 в этом случае нечувствителен к изменению потенциала. Активация Ca^{2+} является кальмодулин-

опосредованной. Семейство этих каналов кодируется четырьмя генами у человека (7, 8).

- 5) Ca^{2+} -Активируемые K^+ каналы большой проводимости (BK_{Ca}) включают каналы, кодирующиеся четырьмя *slo* генами. Два представителя, в отличие от других, содержат семь ТМ сегментов. Интересная особенность этих каналов состоит в том, что они могут быть активированы изменением потенциала и некоторыми ионами (в зависимости от изоформы канала активаторами могут выступать Ca^{2+} , Na^+ , Cl^-) (9).

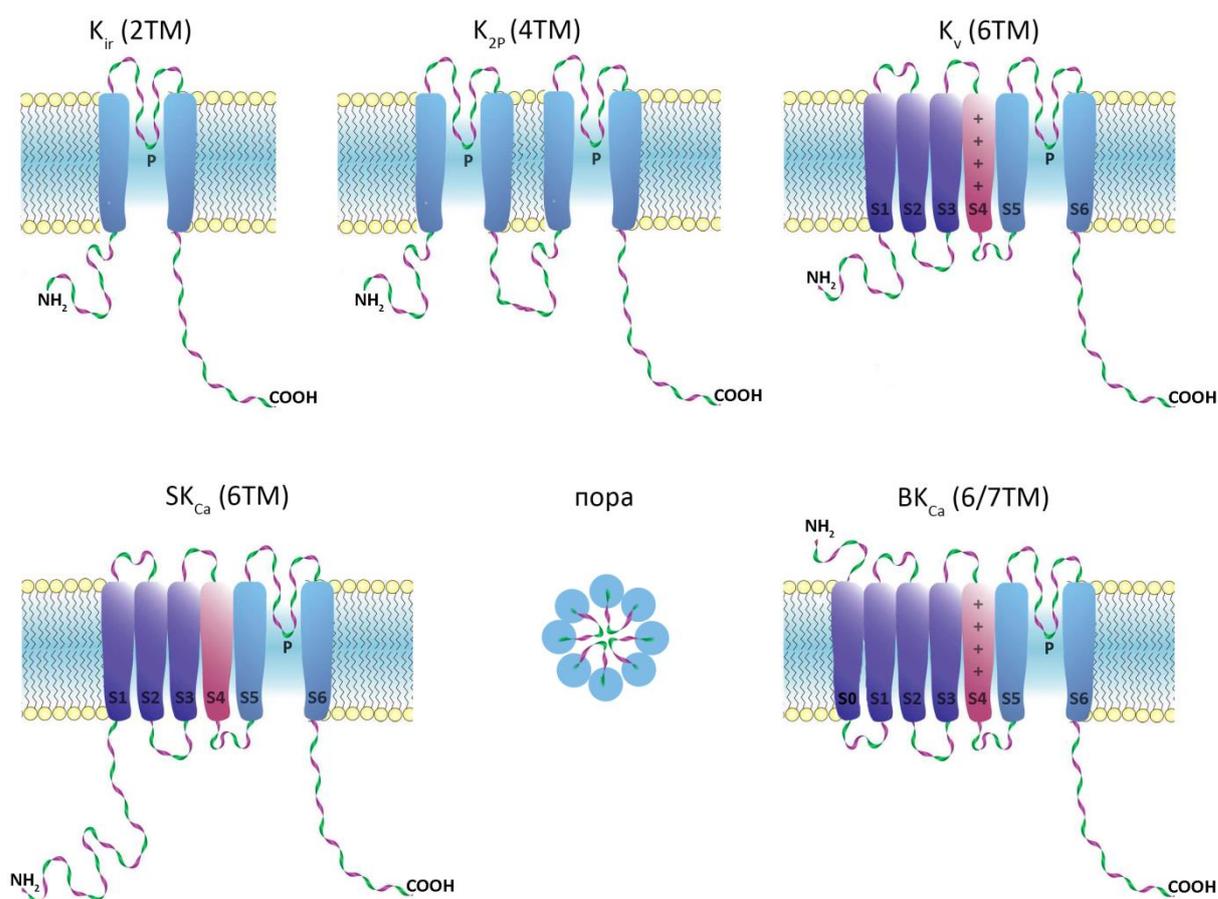


Рисунок 1. Структурные семейства K^+ каналов. На рисунке приведены топологические диаграммы. В центре нижнего ряда схематично изображена пора, образованная четырьмя порвыми участками отдельных субъединиц. ТМ – трансмембранный сегмент, P – поровая петля. S0-S6 – ТМ сегменты. S4 – сенсор потенциала (для K_{v} и BK_{Ca}).

K^+ каналы высших растений можно разделить на три группы: Shaker-подобные, ТРК (от англ. tandem-pore K^+) и K_{ir} -подобные каналы (10). Shaker-подобные каналы растений построены, как и K_{v} , из шести ТМ сегментов и активируются потенциалом. ТРК и K_{ir} -подобные каналы имеют четыре и два ТМ сегмента и являются родственными $\text{K}_{2\text{p}}$ и K_{ir} каналам человека, соответственно (11, 12).

Самая маленькая α -субъединица K^+ канала (94 аминокислотных остатков) найдена у вируса PBCV-1, паразитирующего на зеленых водорослях рода *Chlorella* (13). У прокариотических организмов K^+ каналы чаще всего имеют в составе одной субъединицы два (MthK, $K_{ir}B$ и KcsA) или шесть (Kch, K_vAP и Mlo1) ТМ сегментов. Очень часто эти каналы имеют дополнительные цитоплазматические Ca^{2+} -связывающие или нуклеотид-связывающие домены (14). У грибов найдена K^+ канал-образующая α -субъединица с нестандартной топологией: S1-S2-S3-S4-S5-P-S6-S7-P-S8, которая, по-видимому, не встречается у представителей других царств (15). Удивительным кажется тот факт, что в геноме инфузории *Paramecium tetraurelia* найдено 298 генов K^+ каналов, что в 3,7 раз больше, чем у человека (14).

3.1.1 K^+ каналы входящего выпрямления (K_{ir})

Каналы этого семейства можно разделить на 4 функциональные группы (**Рисунок 2**): 1) классические K_{ir} ; 2) G-белок-активируемые каналы; 3) АТФ-чувствительные K^+ каналы; и 4) калиевые транспортные каналы (3).

Первые K_{ir} каналы были обнаружены по аномальному калиевому току (3). Открытие некоторых K_{ir} каналов модулируется нуклеотидами, такими как АТФ и АДФ, фосфорилированием, G-белками и фосфатидил-инозитол-4,5-дифосфатом (ФИФ₂). Некоторые классические блокаторы калиевых каналов, такие как тетраэтиламмоний (ТЭА) или 4-аминопиридин (4-АП) демонстрируют слабый эффект на представителях этого семейства K^+ каналов (16).

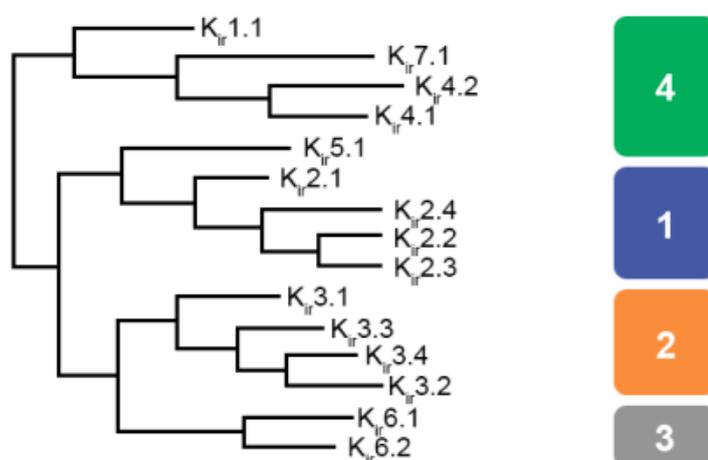


Рисунок 2. Филогенетическое дерево, отображающее многообразие K_{ir} каналов человека и построенное на основании анализа их аминокислотных последовательностей. Справа показана принадлежность каналов к той или иной функциональной группе: 1) классические K_{ir} ; 2) G-белок-активируемые каналы; 3) АТФ-чувствительные K^+ каналы; и 4) калиевые транспортные каналы.

- Классические K_{ir} (K_{ir2})

Каналы этого типа постоянно активны и широко представлены в тканях желудочков сердца, эндотелиальных клетках и гладкой мускулатуре. Они играют важную роль в контроле тонуса (17). Также все изоформы классических K_{ir} каналов экспрессируются в мозге (18), а $K_{ir2.1}$ и $K_{ir2.3}$ обнаружены на микроворсинках Шванновских клеток (19).

- G-белок-активируемые каналы (K_{ir3})

Каналы этого типа (K_G) регулируются работой сопряженного G-белка (20) и построены из различных комбинаций четырех субъединиц ($K_{ir3.1}$ - $K_{ir3.4}$), причем $K_{ir3.1}$ и $K_{ir3.3}$ не могут сами по себе формировать функциональные каналы, а встречаются в виде гетеротетрамеров $K_{ir3.1}/K_{ir3.3}$ и $K_{ir3.2}/K_{ir3.3}$ (21, 22). K_G каналы активируются $\beta\gamma$ -субъединицами G-белков ($G_{\beta\gamma}$), чувствительных к коклюшному токсину (23, 24). Диссоциация $\beta\gamma$ -субъединиц от α -субъединицы G-белка индуцируется связыванием агонистов (ацетилхолина, γ -аминомасляной кислоты или дофамина) с G-белок-сопряженными рецепторами (GPCR) в присутствии ГТФ. K_G каналы ингибируются некоторыми возбуждающими нейромедиаторами или гормонами (например, ацетилхолином, субстанцией P, тиреотропным гормоном) (25). Каналы этого типа встречаются в кардиомиоцитах (26), в клетках поджелудочной железы (27), а также в некоторых отделах мозга, где они располагаются на окончаниях дендритов нейронов (28), например, в клетках Пуркинье (29).

- АТФ-чувствительные K^+ каналы (K_{ir6})

K_{ir6} каналы (K_{ATP}) были впервые обнаружены в сердечной ткани, где они широко представлены в сарколемме (30). Каналы этого типа характеризуются спонтанным открытием, которое ингибируется внутренним АТФ. K_{ATP} каналы – октамеры, состоящие из четырех K_{ir6} и четырех рецепторов сульфонилмочевины (SUR1) (31). Субъединицы K_{ir6} каналы формируют ионную пору, а субъединицы SUR, имеющие два сайта связывания нуклеотид-дифосфатов (АДФ и других), выступают в роли активатора K_{ATP} каналов. В β -клетках поджелудочной железы K_{ATP} каналы, построенные из $K_{ir6.2}$ и SUR1 субъединиц, не только формируют потенциал покоя, но и модулируют секрецию инсулина (32).

- Калиевые транспортные каналы ($K_{ir1.1}$, K_{ir4} , K_{ir5} и $K_{ir7.1}$)

$K_{ir1.1}$ канал имеет 6 альтернативных сплайс-форм (3). Этот канал найден в клетках различных тканей и отвечает за формирование потенциала покоя (33). K_{ir4} и $K_{ir5.1}$ по

большой части экспрессируются в глиальных клетках, причем $K_{ir}4.1$ встречаются в виде гомотетрамеров и гетеротетрамеров с $K_{ir}5.1$, а $K_{ir}5.1$ физиологически активны только в гетеротетрамерном виде с $K_{ir}4.1$ и $K_{ir}4.2$ (34). Основная функция этих каналов – устранение избытка внеклеточного K^+ , образующегося в результате возбуждения нейронов (35). Физиологическая роль $K_{ir}7.1$ пока не ясна (3).

3.1.2 K^+ каналы, имеющие два поровых участка (K_{2P})

α -Субъединица каналов этого типа имеет два поровых участка, а функциональный канал представляет собой димер (36). K_{2P} каналы принимают участие в формировании потенциала покоя и регулировании клеточной возбудимости (37). В настоящее время у человека идентифицировано 15 генов (*KCNKI-15*), а сами каналы, в зависимости от структуры генов, формально классифицируют как $K_{2P}1$, $K_{2P}2$ и другие (38).

Работа K_{2P} каналов регулируется широким спектром стимулов, например, рН, температурой и мембранным натяжением (5, 37). Представители семейства K_{2P} каналов объединяют в несколько подсемейств (**Рисунок 3**), в зависимости от ответа на различные стимулы: 1) механочувствительные; 2) активируемые щелочью; 3) Ca^{2+} -активируемые; 4) «слабые» каналы входящего выпрямления; 5) ингибируемые кислотой; 6) галотан-ингибируемые (39). $K_{2P}7.1$, $K_{2P}12.1$ и $K_{2P}15.1$ не формируют функциональных каналов, возможно, для этого им необходимы дополнительные мембранные белки (40).

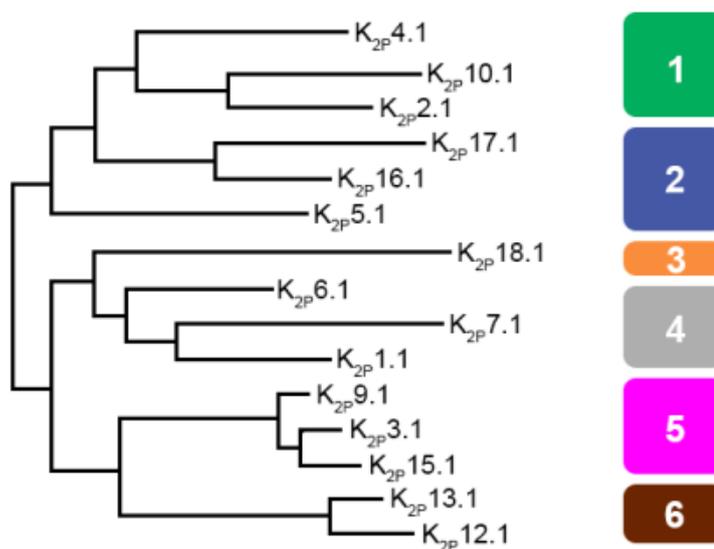


Рисунок 3. Филогенетическое дерево, отображающее многообразие K_{2P} каналов человека и построенное на основании анализа их аминокислотных последовательностей. Справа показана принадлежность каналов к той или иной группе, согласно чувствительности к различным стимулам: 1) механочувствительные; 2) активируемые щелочью; 3) Ca^{2+} -активируемые; 4) «слабые» каналы входящего выпрямления; 5) ингибируемые кислотой; 6) галотан-ингибируемые.

Представители различных подсемейств, несмотря на общую молекулярную архитектуру, имеют низкое сходство аминокислотной последовательности (39).

Большинство изоформ K^+ каналов с двумя поровыми участками самоорганизуются в гомодимеры (41). В отличие от K_v или K_{ir} каналов, формирующихся нековалентным взаимодействием четырех мономеров, субъединицы K_{2P} каналов образуют межмолекулярную дисульфидную связь (41, 42).

K_{2P} каналы встречаются в кардиомиоцитах (43), а также тканях периферической и центральной нервной системы (ЦНС) (44, 45).

3.1.3 Потенциал-зависимые K^+ каналы (K_v)

Это наиболее разнообразное (40 генов у человека) семейство K^+ каналов. Их α -субъединицы имеют шесть трансмембранных сегментов. Сюда же относятся калиевые каналы насекомых *Shaker*, *Shab*, *Shaw* и *Shal*. Для полной функциональной активности K_v каналов необходимо взаимодействие четырех α -субъединиц с образованием поры в центре тетрамерной структуры (46). Аминокислотная последовательность гидрофобных участков, включая сенсор потенциала, высококонсервативна. Несколько кристаллических структур K_v каналов было разрешено в лаборатории МакКиннона: K_vAP – канал из археи *Aeropyrum pernix* (47), $K_v1.2$ (48) и химерный $K_v1.2$ - $K_v2.1$ (49).

3.1.3.1 Доменная организация K_v каналов

Мембранные участки α -субъединиц K_v каналов состоят из двух частей (**Рисунок 4**): поровой, образованной двумя трансмембранными сегментами (S5-S6) с поровой (P) петлей между ними, и потенциал-чувствительной, образованной четырьмя трансмембранными сегментами (S1-S4). У зрелого K_v канала можно выделить поровый домен, образованный четырьмя поровыми частями каждой α -субъединицы, четыре потенциал-чувствительных домена, а также четыре цитоплазматических домена (48).

Поровый домен K_v каналов устроен так же, как у потенциал-зависимых Na^+ и Ca^{2+} каналов, и имеет похожий принцип работы, позволяющий пропускать примерно 10^6 - 10^8 ионов K^+ в секунду в открытом состоянии (50, 51). K_v каналы – одно из самых разнообразных семейств мембранных белков (52), но все его представители имеют высококонсервативный участок из семи аминокислотных остатков TTVGYGD (53), который формирует структуру селективного фильтра. Благодаря ему K_v каналы пропускают ионы K^+ с высокой избирательностью, по сравнению, например, с Na^+ , радиус которых всего лишь на 0,4 Å меньше. Такая высокая селективность обеспечивается атомами кислорода внутри поры, которые координируют ионы K^+ , лишённые гидратной

оболочки. При этом радиус Na^+ слишком мал для того, чтобы образовывать устойчивые координационные связи. Карбонильные атомы кислорода полипептидной цепи с четырех сторон стабилизируют дегидратированные ионы K^+ , выполняя функцию заменителя гидратной оболочки во время движения ионов через пору (54). Когда в лаборатории МакКиннона была получена кристаллическая структура бактериального K^+ канала KcsA (46), было доказано, что гипотеза, предложенная Ходжкиным в 1955 году для калиевого тока в гигантском аксоне кальмара, верна: ионы двигаются в пору друг за другом по очереди (55). При движении извне внутрь клетки ионы K^+ сначала попадают во внешний вестибуль, затем, лишаясь гидратной оболочки, проходят через селективный фильтр, во внутренней полости канала обратно гидратируются и выходят через внутренние ворота. Также ионы могут двигаться и в обратном направлении (56).

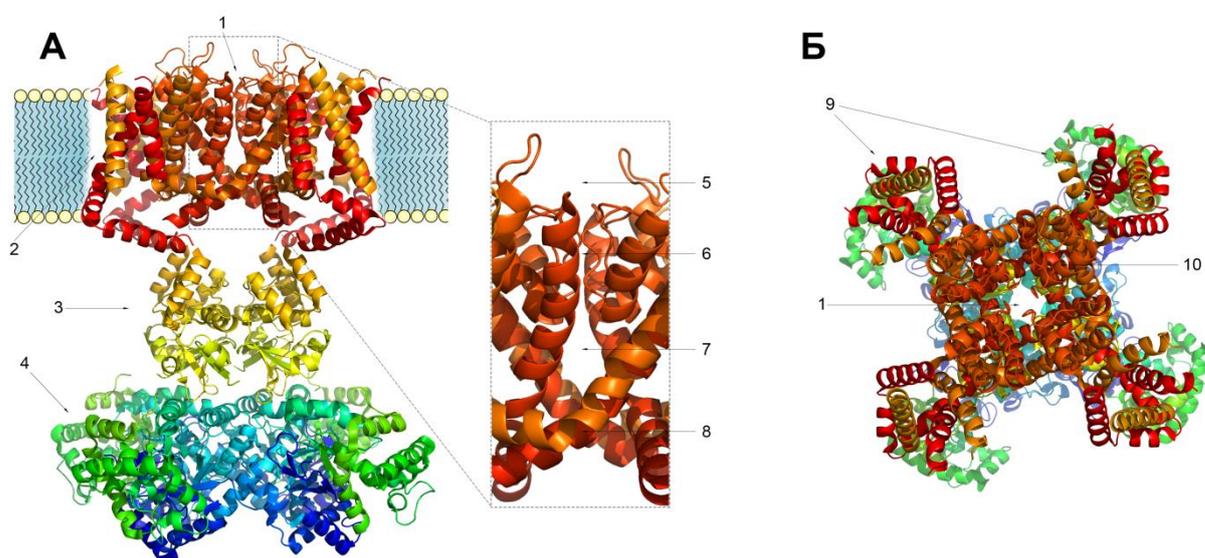


Рисунок 4. Пространственная организация потенциал-зависимого K^+ канала на примере $\text{K}_v1.2$ (код в базе данных пространственных структур полипептидов (PDB ID): 2A79). А – вид сбоку, Б – вид с внеклеточной стороны. 1 – пора, 2 – гомотетрамер мембранных частей α -субъединиц, 3 – цитоплазматический домен α -субъединиц, 4 – β -субъединицы, 5 – внешний вестибуль, 6 – селективный фильтр, 7 – внутренняя полость, 8 – внутренние ворота, 9 – потенциал-чувствительные домены, 10 – поровый домен.

Потенциал-чувствительные домены отвечают за способность K_v каналов реагировать на изменение потенциала на мембране клетки. Происходит своеобразная конверсия энергии электрического поля, накопленной на мембране, в механическую энергию, которая передается на поровый домен, заставляя его менять конформацию и открывать пору. S4 при этом выполняет функцию сенсора потенциала из-за обилия положительно заряженных аминокислотных остатков (57). Движение сенсора потенциала, делающее возможным открытие поры канала, требует физического взаимодействия между некоторыми аминокислотными остатками ТМ S6 и примембранной спирали между S4 и

S5 (58, 59). Цитоплазматический домен принимает важное участие в регуляции работы канала, например, в инактивации N-типа (см. ниже), а также в некоторых случаях в тетрамеризации α -субъединиц (60).

3.1.3.2 Механизм работы K_v каналов

Механизм работы K_v каналов подразумевает переход этих белков в различные конформационные состояния (**Рисунок 5**). При потенциале покоя K_v каналы находятся в закрытом состоянии, через такие каналы ток ионов не проходит. Открытие каналов возможно в ответ на рост мембранного потенциала (деполяризацию) (61), который действует на заряженные аминокислотные остатки сенсора потенциала (62). Трансмембранный сегмент S4 реагирует на эти изменения, что приводит к конформационным изменениям потенциал-чувствительного домена, передающимся на поровый домен (63). Изменения потенциала могут быть незначительными, но за счет исключительной чувствительности сенсора канал реагирует даже на них (64). Пора открывается тогда, когда активируются все четыре сенсора потенциала (65). В открытом состоянии канал начинает пропускать ионы, пока не перейдет в фазу инактивации.

Инактивация K_v возможна по двум различным сценариям, которые получили названия инактивации N- и C-типа. Инактивация N-типа заключается в том, что подвижный N-концевой участок α -субъединицы канала блокирует пору с внутренней стороны. Конформация канала при этом соответствует открытому состоянию (66). Удаление этого участка приводит к тому, что инактивация перестает протекать по механизму N-типа, а возвращение его в систему в виде отдельной пептидной молекулы нормализует инактивацию (67, 68). Более медленная инактивация C-типа протекает даже без N-концевого цитоплазматического участка канала (69). Структурные детерминанты, отвечающие за этот тип инактивации, расположены во внешнем вестибуле селективного фильтра (70), а также недалеко от N-конца S6 (71). Инактивация C-типа происходит за счет конформационных изменений во внешнем вестибуле канала и сужения устья, что приводит к остановке тока ионов (72). Понижение потенциала до состояния покоя (реполяризация) приводит к тому, что каналы переходят из инактивированного в закрытое состояние.

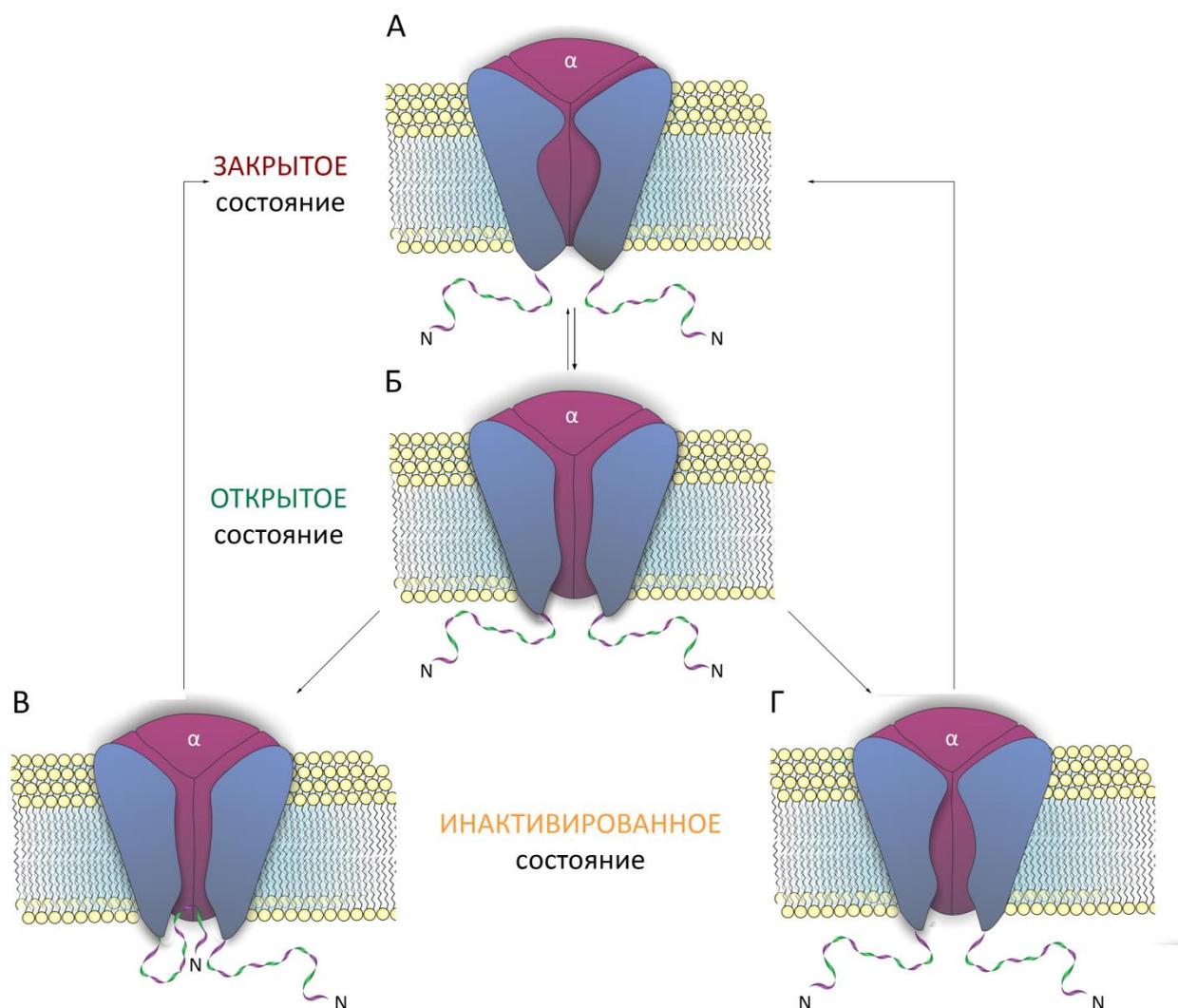


Рисунок 5. Схематичное изображение механизма работы потенциал-зависимого K^+ канала. А – закрытое состояние, Б – открытое (активированное) состояние, В – инактивация N-типа, Г – инактивация С-типа.

3.1.3.3 Классификация K_v каналов

У позвоночных семейство K_v каналов состоит из 12 подсемейств (K_v1 – K_v12), согласно сходству аминокислотных последовательностей (**Рисунок 6**). K_v1 , K_v2 , K_v3 и K_v4 – гомологи K^+ каналов плодовой мушки *Drosophila melanogaster*, именуемых *Shaker*, *Shab*, *Shaw* и *Shal*, соответственно (6). Широкое разнообразие K_v каналов образуется в результате: 1) гетеромультимеризации – образования тетрамеров из разных α -субъединиц и, как следствие, – приобретения каналом новых характеристик. Гетеротетрамеризация может происходить с участием неактивных субъединиц K_v5 , K_v6 , K_v8 и K_v9 , которые не способны сами по себе образовывать функционирующие гомотетрамеры (6); 2) взаимодействия тетрамеров из α -субъединиц с β -субъединицами. Например, $K_v1.1$ – канал

задержанного выпрямления, но когда та же изоформа экспрессируется со вспомогательной субъединицей $K_v\beta 1.1$, канал превращается в быстро инактивируемый (73); 3) альтернативного сплайсинга (6); 4) редактирования мРНК, например дезаминирования (74); 5) посттрансляционных модификаций, таких как фосфорилирование (75), пальмитилирование (76) и убиквитинилирование (77). Согласно физиологическим характеристикам K_v можно разделить на несколько групп: 1) задержанного выпрямления; 2) А-типа; 3) EAG каналы; 4) «модификаторы» (**Рисунок 6**).

3.1.3.3.1 K_v каналы задержанного выпрямления

Термин «задержанное выпрямление» был введен Ходжкином и Хаксли для описания выходящего калиевого тока в модели гигантского аксона кальмара, потому что он запаздывал по сравнению с натриевым током (78). В отличие от представителей K_v каналов А-типа (см. ниже), большинство представителей K_v1 не испытывают быстрой инактивации, если не сопряжены с β -субъединицами (79).

Наиболее полную фармакологическую характеристику получили $K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v1.3$ и $K_v1.5$ каналы, чувствительные к 4-АП, флекаиниду, капсаицину и нифедипину (50). Эффективная концентрация ТЭА, блокирующего эти каналы варьирует в миллимолярном диапазоне. $K_v1.1$ экспрессируется в мозге, сетчатке, скелетной и сердечной мускулатуре (80, 81). $K_v1.2$ обнаружен в мозге (преимущественно в варолиевом мосту, мозжечке и среднем мозге), спинном мозге, Шванновских клетках, островках Лангерганса, сетчатке и гладкой мускулатуре (82). $K_v1.3$ экспрессируется в мозге, легких, тимусе, лимфатических узлах, фибробластах, макрофагах, В- и Т-лимфоцитах (80, 82). Установлено, что $K_v1.3$ является терапевтической мишенью в случае ряда аутоиммунных заболеваний. Блокирование данной изоформы K^+ каналов приводит к ингибированию кальциевого ответа, продукции цитокинов, пролиферации и подвижности аутореактивных Т-клеток (83). $K_v1.5$ экспрессируется в аорте, сердце, толстом кишечнике, почках, желудке, гладкой мускулатуре, гиппокампе и коре головного мозга (82, 84). Информации по $K_v1.6$, $K_v1.7$ и $K_v1.8$ в настоящее время мало.

$K_v2.1$ присутствует во всех нейронах ЦНС (85), а $K_v2.2$ экспрессируется в ГАМКергических нейронах (86). Судя по всему, эта изоформа каналов присутствует в большинстве тканей организма, причем в гомотетрамерном виде (87). Однако, $K_v2.1$ могут формировать гетеротетрамеры с субъединицами K_v5 , K_v6 , K_v8 и K_v9 , что приводит к различной модификации функций канала (6). Модуляция K_v2 может осуществляться фосфорилированием (85), а ханатоксин ингибирует канал за счет связывания с сенсором потенциала (88).

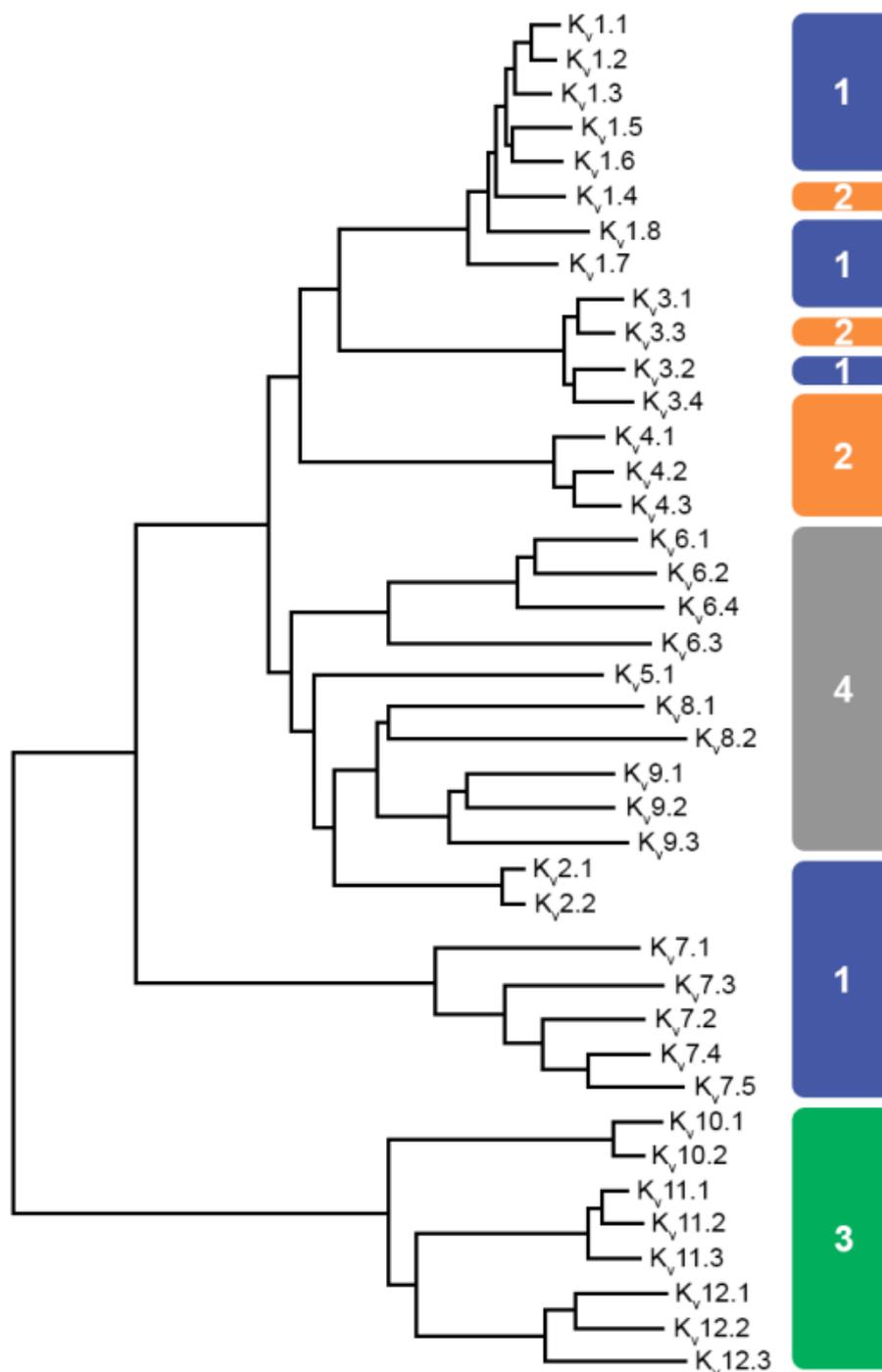


Рисунок 6. Филогенетическое дерево, отображающее многообразие K_v каналов человека и построенное на основании анализа их аминокислотных последовательностей. Справа показана принадлежность каналов к той или иной группе, согласно физиологическим характеристикам: 1) задержанного выпрямления; 2) А-типа; 3) EAG каналы; 4) «модификаторы».

В то время как $K_v3.3$ и $K_v3.4$ обуславливают быстро инактивируемый ток А-типа (см. ниже), $K_v3.1$ и $K_v3.2$ – классические каналы задержанного выпрямления (89), экспрессирующиеся главным образом в мозге, но также встречающиеся в скелетной мускулатуре, гладкой мускулатуре крупных артерий и зародышевых тканях (80). Каналы

этого типа блокируются 4-АП и ТЭА (50), $K_v3.2$, кроме того, чувствителен к токсину ShK из анемоны *Stichodactyla helianthus* (90).

Каналы изоформы K_v7 также широко представлены в различных тканях и органах: мозге, нервных ганглиях, сердце, поджелудочной железе, почках, легких, плаценте и ухе. Встречаются в виде гомо- и гетеротетрамеров ($K_v7.2/K_v7.3$). $K_v7.4$ каналы экспрессируются в волосковых клетках уха и нейронах слуховой сенсорной системы (82, 91).

3.1.3.3.2 K_v каналы A-типа

Данная группа включает в себя каналы, которые быстро активируются и быстро инактивируются: $K_v1.4$, $K_v3.3$, $K_v3.4$ и $K_v4.1$ - $K_v4.3$ (1).

α -Субъединицы $K_v1.4$ могут образовывать как гомотетрамеры, так и гетеротетрамеры с другими K_v1 субъединицами. В случае гомотетрамеризации $K_v1.4$, чувствительные к микромолярным концентрациям 4-АП, рилузолу и хинидину, экспрессируются в мозге, скелетной мускулатуре, сердце и клетках островков Лангерганса поджелудочной железы (92). Два представителя K_v3 , а именно $K_v3.3$ и $K_v3.4$, входящие в данную группу, также были обнаружены в мозге, скелетной мускулатуре и клетках островков Лангерганса (93). Для K_v4 найдены три изоформы ($K_v4.1$ - $K_v4.3$), формирующие преимущественно гетеротетрамеры. У человека гены соответствующих каналов содержат по шесть экзонов, поэтому возможно существование нескольких сплайс-вариантов с различными физиологическими характеристиками (94). K_v4 распространены в мозге, сердце, скелетной мускулатуре, легких, желудке, толстом кишечнике и почках (6).

3.1.3.3.3 EAG каналы

Каналы этой группы (K_v10 , K_v11 и K_v12) кодируются высокоомологичными генами *eag*, *erg* и *elk*, соответственно (95). Для K_v10 известно две редко встречающиеся изоформы: $K_v10.1$ и $K_v10.2$. $K_v10.1$ была найдена в мозге и в меньшей степени представлена в поджелудочной железе, миообластах и некоторых линиях раковых клеток, в то время как $K_v10.2$ встречаются только в ЦНС (96, 97). Предполагается, что $K_v10.1$ может выступать в качестве маркера опухолевых клеток (98).

$K_v11.1$, $K_v11.2$ и $K_v11.3$ – три изоформы K_v11 , найденные в сердце, мозге, почках, печени, тестикулах и простате (96, 99). Эти каналы способны формировать гетеротетрамеры, которые блокируются сертиндолом и пимозидом (100). Недавно появились сведения, что активаторы $K_v11.1$ могут представлять терапевтический интерес при некоторых типах сердечной аритмии (101, 102).

Каналы группы K_v12 ($K_v12.1$, $K_v12.2$, и $K_v12.3$) в настоящее время найдены в форме гетеротетрамеров (103). Они экспрессируются в основном в нервной системе и характеризуются медленной активацией и инактивацией (103, 104).

3.1.3.3.4 «Модификаторы»

Название «модификаторы» эти каналы (K_v5 , K_v6 , K_v8 и K_v9) получили вследствие того, что не могут организовываться в активные гомотетрамеры, а гетеромультимеризуются с K_v2 , модифицируя функции последних (105–107).

3.1.4 Ca^{2+} -Активируемые K^+ каналы малой и средней проводимости (SK_{Ca} , IK_{Ca})

Ca^{2+} -Активируемые K^+ каналы малой (SK_{Ca}) и средней проводимости (IK_{Ca}) были названы так, потому что их пропускная способность в ~10-20 раз ниже, чем у Ca^{2+} -активируемых K^+ каналов большой проводимости (BK_{Ca}) (108). Эти каналы кодируются четырьмя генами: *KCNN1* ($K_{Ca2.1}$), *KCNN2* ($K_{Ca2.2}$), *KCNN3* ($K_{Ca2.3}$) и *KCNN4* ($K_{Ca3.1}$) (Рисунок 7) (7) и, как следует из названия, активируются увеличением внутриклеточной концентрации Ca^{2+} (109). Гены, кодирующие эти каналы, имеют несколько экзонов: в результате сплайсинга может образовываться большое количество сплайс-вариантов с разными физиологическими характеристиками (110) и локализацией (111). $K_{Ca2.1}$ и $K_{Ca2.2}$ широко представлены в ЦНС, а $K_{Ca2.2}$ помимо того локализуется в сенсорных нейронах, микроглии и кардиомиоцитах; $K_{Ca2.3}$ встречается в нейронах и глиальных клетках (112), а $K_{Ca3.1}$, помимо нервной и мышечной систем, экспрессируется в лимфоцитах и эндотелиальных клетках (1).

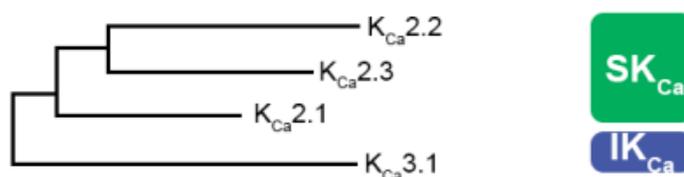


Рисунок 7. Филогенетическое дерево, отображающее многообразие Ca^{2+} -активируемых K^+ каналов малой (SK_{Ca}) и средней проводимости (IK_{Ca}) человека и построенное на основании анализа их аминокислотных последовательностей.

SK_{Ca} и IK_{Ca} имеют шесть ТМ сегментов и могут формировать функционально-активные гомотетрамеры (113) и гетеротетрамеры (114). В отличие от других каналов (K_v или BK_{Ca}), ТМ сегмент S4 нечувствителен к изменению потенциала, а в отличие от BK_{Ca} , имеющих сайт связывания Ca^{2+} на α -субъединице, SK_{Ca} и IK_{Ca} образуют стабильный

комплекс с кальмодулином (CaM), белком, работающим как сенсор Ca^{2+} (115). В случае SK_{Ca} связывание кальция кальмодулином, взаимодействующим с С-концевым внутриклеточным участком канала, инициирует открытие последнего. SK_{Ca} и IK_{Ca} чувствительны к различным фармакологическим агентам, включая апамин, токсин из яда пчелы *Apis mellifera* (108), тубокурарин (116) и сциллатоксин (117).

3.1.5 Ca^{2+} -Активируемые K^+ каналы большой проводимости (BK_{Ca})

Семейство этих каналов, кодирующихся генами *slo*, характеризуется чрезвычайно высокой проводимостью (9) и также называется ВК (от англ. big potassium) или макси-К каналами. Первый представитель семейства был клонирован из мутанта *D. melanogaster* «копуша» (от англ. slowpoke, Slo) (118, 119). У млекопитающих BK_{Ca} кодируются четырьмя генами (*KCNMA1*, *KCNT1*, *KCNT2* и *KCNU1*), а их продукты принято классифицировать как $\text{K}_{\text{Ca}}1.1$, $\text{K}_{\text{Ca}}4.1$, $\text{K}_{\text{Ca}}4.2$ и $\text{K}_{\text{Ca}}5.1$, соответственно (7) (**Рисунок 8**). $\text{K}_{\text{Ca}}1.1$ активируются потенциалом и ионами Ca^{2+} (120); $\text{K}_{\text{Ca}}4.1$ и $\text{K}_{\text{Ca}}4.2$, несмотря на принадлежность к семейству Ca^{2+} -активируемых K^+ каналов, активируются повышением внутриклеточной концентрации Na^+ и Cl^- , а в случае $\text{K}_{\text{Ca}}4.2$ еще и потенциалом (121, 122); $\text{K}_{\text{Ca}}5.1$ активируются потенциалом и увеличением pH внутри клетки (123).

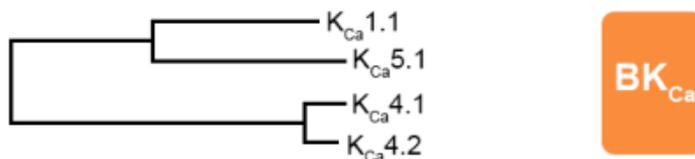


Рисунок 8. Филогенетическое дерево, отображающее многообразие Ca^{2+} -активируемых K^+ каналов большой проводимости (BK_{Ca}) человека. Дерево построено на основании сходства аминокислотных последовательностей каналов.

BK_{Ca} каналы представляют собой гомотетрамеры, причем мономеры $\text{K}_{\text{Ca}}1.1$ и $\text{K}_{\text{Ca}}5.1$ имеют семь ТМ сегментов, а $\text{K}_{\text{Ca}}4.1$ и $\text{K}_{\text{Ca}}4.2$ – шесть ТМ (1). ТМ сегмент S4 выполняет роль сенсора потенциала (124), а на удлинённом С-концевом участке, в зависимости от типа канала, находятся сайты связывания Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- или H^+ (122, 125–127).

K_{Ca}1.1 (Slo1)

Аналог $\text{K}_{\text{Ca}}1.1$ млекопитающих (Slo1) был впервые охарактеризован в мутантной *D. melanogaster*, которая демонстрировала замедленный ответ на тепловой шок и плохо летала. Мышечные клетки этого мутанта потеряли Ca^{2+} -активируемый K^+ ток, обычно регистрируемый уже на ранних личиночных стадиях (95).

В отличие от K_v каналов, $K_{Ca1.1}$ имеют семь трансмембранных сегментов, а их N -концевая часть ориентирована во внеклеточное пространство. Когда были проведены эксперименты по измерению тока через отдельный канал, выяснилось, что вероятность открытия $Slo1$ увеличивается при росте потенциала или при увеличении внутриклеточной концентрации Ca^{2+} (128–130).

В геноме млекопитающих найден всего лишь один ген, кодирующий K_{Ca1} , однако было описано как минимум 11 сплайс-вариантов, экспрессирующихся в различных тканях и типах клеток (131) и имеющих различную кинетику работы и чувствительность к Ca^{2+} (132, 133). Например, наиболее изученная сплайс-форма STREX экспрессируется в стрессовых условиях (134), а еще два варианта «заставляют» канал оставаться в мембранах клеточных органелл (135). $K_{Ca1.1}$ чувствительны к действию поровых блокаторов: ТЭА (136), харибдотоксина (ChTx) (137) и ибериотоксина (IbTx) (138).

Каналы этой изоформы широко представлены в различных тканях, а основные места их локализации – мозг (мозжечок, полосатое тело, кора и гиппокамп), скелетная и гладкая мускулатура, кора надпочечников, волосковые клетки уха, островки Лангерганса, эпителий толстого кишечника и почки (139–141). Интересно, что помимо цитоплазматической мембраны, $K_{Ca1.1}$ были обнаружены в мембранах митохондрий (142).

K_{Ca4} (Slo2)

Каналы этой группы, активирующиеся ионами Na^+ , были впервые описаны в кардиомиоцитах (143), а позднее и в мозге (144). На молекулярном уровне K_{Ca4} , α -субъединицы которых построены из шести ТМ сегментов, получили характеристику значительно позднее (121, 145). У млекопитающих было отмечено, что, помимо Na^+ , каналы также реагируют на внутриклеточную концентрацию ионов Cl^- (122), причем эта чувствительность у $K_{Ca4.1}$ выше, чем у $K_{Ca4.2}$. Подобно $K_{Ca1.1}$, эти каналы имеют большую проводимость, а $K_{Ca4.2}$ могут гетеротетрамеризоваться с $K_{Ca1.1}$, приобретая новые биофизические характеристики (146). Для $K_{Ca4.2}$ характерно наличие нескольких сплайс-вариантов (147). K_{Ca4} экспрессируются в головном мозге (148), мотонейронах спинного мозга (149), почках (145) и сердце (121).

$K_{Ca5.1}$ (Slo3)

Эта изоформа была обнаружена только у млекопитающих и локализована только в клетках семенников (150). Считается, что $K_{Ca5.1}$ играют важную роль в капацитации сперматозоида, процессе проникновения последнего через оболочку яйцеклетки. Интересной особенностью этих каналов является то, что они активируются не только

потенциалом, но и увеличением pH (защелачиванием) внутри клетки (125). $K_{Ca5.1}$, как и $K_{Ca1.1}$, чувствительны к ТЭА, IbTx и ChTx (151). В селективном фильтре канала канонический для большинства представителей суперсемейства тирозин заменен на фенилаланин, что делает $K_{Ca5.1}$ менее избирательными к K^+ по сравнению с Na^+ (123).

3.1.6 Вспомогательные субъединицы K^+ каналов

Как уже было отмечено, порообразующие α -субъединицы K^+ каналов могут быть ассоциированы с вспомогательными β -субъединицами. Наиболее хорошо изучены β -субъединицы потенциал-зависимых K^+ каналов ($K_v\beta$), которые способны сильно модифицировать кинетику работы каналов (152). Например, $K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v1.3$ и $K_v1.5$ – типичные каналы задержанного выпрямления, но когда они ассоциируются с $K_v\beta1.1$, то становятся быстро инактивируемыми каналами, подобными *Shaker* из *D. melanogaster* (73, 79). У K_v4 встречаются два вида вспомогательных субъединиц (75): цитоплазматический Ca^{2+} -связывающий белок (KChIP) (153) и трансмембранный дипептидил-пептидазоподобный белок (DPPX) (154). KChIP увеличивает экспрессию K_v4 и замедляет инактивацию и скорость возвращения канала в закрытое состояние (155). Совместная экспрессия KChIP, DPPX и K_v4 в различных комбинациях приводит к тому, что свойства канала могут сильно меняться (75). Кроме того, существует целый ряд других вспомогательных субъединиц у K_v каналов (156), а для некоторых даже была продемонстрирована ферментативная активность (157).

Несколько видов вспомогательных субъединиц известно для VK_{Ca} , в частности, для $K_{Ca1.1}$ (1). $VK\beta1$ -субъединицы увеличивают чувствительность канала к Ca^{2+} , но замедляют при этом кинетику его работы (158). $VK\beta2$ -субъединицы увеличивают чувствительность не только к Ca^{2+} , но и к изменению потенциала, а также индуцируют быструю и полную инактивацию. N-Концевой участок $VK\beta2$ способен взаимодействовать с рецепторным сайтом на α -субъединице, который становится доступным только в открытом состоянии канала (158, 159). $VK\beta3$ также индуцируют быструю инактивацию VK_{Ca} , но, в отличие от $VK\beta2$, неполную (160). $VK\beta4$ понижают чувствительность канала к Ca^{2+} в низких концентрациях и увеличивают – при высоких (161).

3.2 Лиганды K^+ каналов

Лиганды, связывающиеся с K^+ каналами, можно разделить на несколько групп, основными из которых являются: ионы металлов (162), небольшие органические молекулы (163) и полипептидные токсины (164). Все лиганды K^+ каналов по своей функциональной природе можно разделить на поровые блокаторы и модуляторы. Первые, как следует из названия, блокируют ионный ток, проходящий через канал, путем взаимодействия с поровой областью мембранного белка (165). Модуляторы не блокируют ток напрямую, а могут взаимодействовать с другими участками канала (например, с сенсорным доменом или вспомогательной β -субъединицей) и, например, модифицировать его функциональные свойства (**Рисунок 9**) (166, 167).

Помимо указанных основных групп лигандов, для некоторых изоформ K^+ каналов были получены антитела, способные селективно блокировать ионный ток (168). Были обнаружены лиганды K^+ каналов в секрете паразитических червей (169), а также показан эффект дефензинов из различных источников на калиевый ток (170, 171).

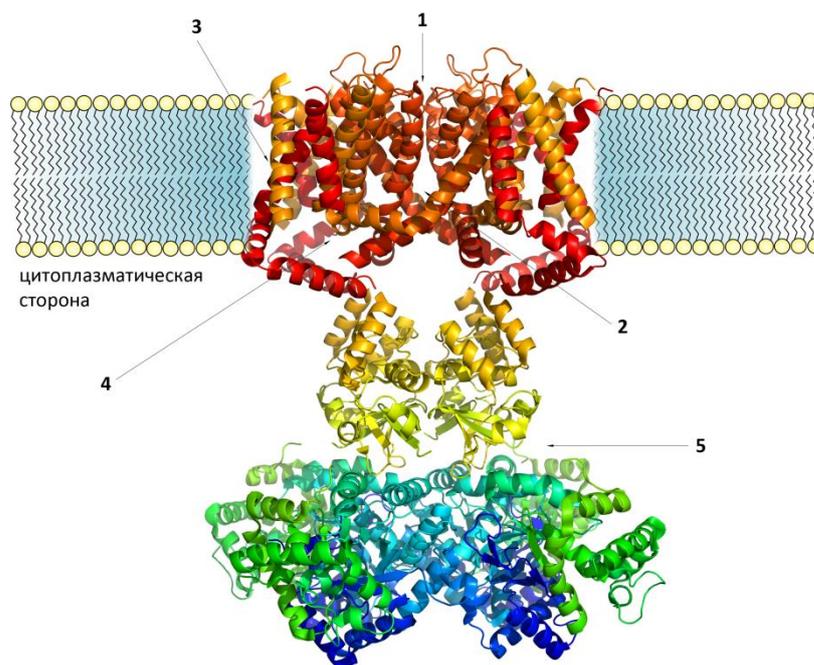


Рисунок 9. Сайты взаимодействия различных лигандов с K^+ каналами. 1 – блокаторы внешней части поры, 2 – блокаторы внутренней части поры, 3, 4 – модуляторы, действующие с наружной и внутренней стороны мембраны, 5 – ингибиторы инактивации.

Ионы таких металлов, как Cs^+ , Ba^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} и другие, выступают в роли неселективных блокаторов большинства изоформ K^+ каналов, действуя в миллимолярных концентрациях (172). Ионы металлов главным образом использовались

на ранних этапах изучения основ работы K^+ каналов (173), а в настоящее время это место принадлежит более аффинным и селективным лигандам (174).

3.2.1 Небольшие органические молекулы

На раннем этапе изучения ионных токов для фармакологической идентификации K^+ каналов использовались, в основном, два агента: 4-аминопиридин (4-АП) и тетраэтиламмоний (ТЭА), ингибирующие большинство K^+ каналов в миллимолярных концентрациях без воздействия на Na^+ и Ca^{2+} каналы (136, 175). Для некоторых K^+ каналов, таких как $K_v3.1$ или $K_v4.1$, не было найдено ни одного другого низкомолекулярного лиганда (174). Органические соединения (хинидин, d-тубокурарин и верапамил), связывающиеся с внутренней частью поры канала, также действуют на широкий спектр K^+ каналов (176–178). Некоторые низкомолекулярные лиганды K^+ каналов показаны на **Рисунке 10**.

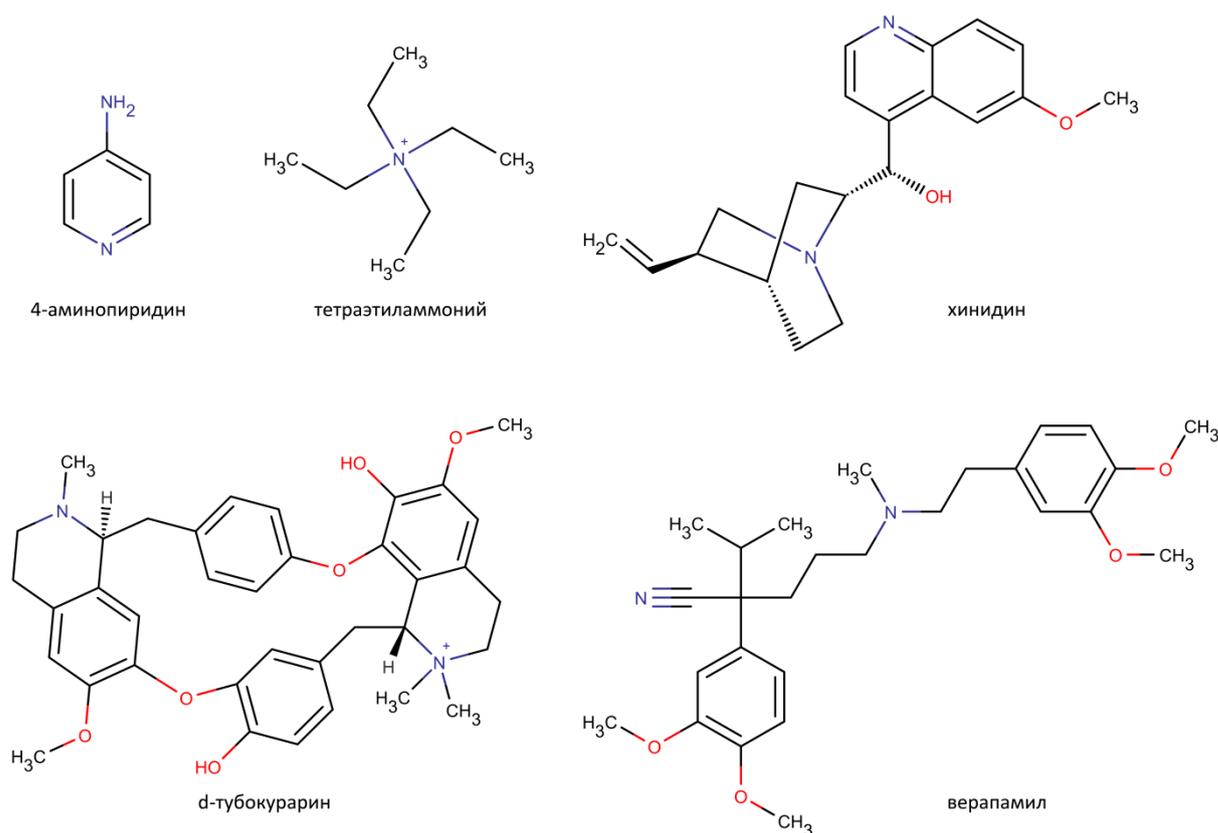


Рисунок 10. Неселективные блокаторы K^+ каналов: 4-АП и ТЭА, хинидин, d-тубокурарин и верапамил.

ТЭА и молекулы с похожим типом строения блокируют K^+ каналы как с внеклеточной, так и с цитоплазматической стороны (179). Другие гидрофобные катионы (d-тубокурарин и верапамил), также «затыкают» своей аммониевой или аминной группой

внутреннюю часть поры, что блокирует калиевый ток (**Рисунок 11**) (180). Несколько другой механизм описан для 4-АП, который обладает весьма сходными с гидрофобными катионами молекулярными характеристиками: взаимодействует с каналом в открытом состоянии, конкурирует с ТЭА за сайт связывания в открытом канале и остается связанным с каналом в закрытом состоянии. Однако маленький размер 4-АП не позволяет молекуле «закупоривать» пору. Согласно современным представлениям, сайт 4-АП располагается в полости между ТМ сегментами S6 (181). Когда канал открывается, блокатор достигает своего сайта и связывается с ним, что стабилизирует канал в закрытом состоянии, при котором ток ионов невозможен (182).



Рисунок 11. Пространственная структура комплекса KcsA с тетрабутиламмонием (PDB ID: 2JK5), канал находится в закрытом состоянии. Представлены проекции канала сбоку и с внеклеточной стороны; справа продемонстрирована структурная формула блокатора.

Помимо описанных выше неселективных соединений существует внушительный список блокаторов и активаторов K^+ каналов, действующих с высокой избирательностью. Такие вещества изначально разрабатывались как прототипы лекарственных препаратов, а некоторые из них уже находятся в клинической практике (174). Ниже в **Таблице 1** представлен список наиболее «популярных» блокаторов и активаторов K^+ каналов, известных в настоящее время, а на **Рисунке 12** изображены структурные формулы некоторых из них.

Таблица 1. Наиболее известные блокаторы и активаторы K^+ каналов. ¹ – неселективные блокаторы, изображенные на **рисунке 10**, ² – блокаторы и активаторы, представленные на **рисунке 12**. Информация по данным Международного союза фундаментальной и клинической фармакологии (IUPHAR) (2, 4, 6, 7).

K^+ канал	Блокаторы	Активаторы
K_{ir}		
$K_{ir1.1}$	VU591	-
$K_{ir2.1}$	спермин, спермидин, путресцин	ФИФ ₂
$K_{ir2.2}$	спермин, спермидин	-
$K_{ir2.3}$	ТЭА, спермин, спермидин, путресцин, SCH-23390	тенидап, арахидоновая кислота
$K_{ir2.4}$	-	-
$K_{ir3.1}$	AZD2927	этанол, ФИФ ₂ , ML297
$K_{ir3.2}$	пимозид, тиоридазин, галоперидол, галотан, флуоксетин, SCH23390, верапамил ¹ , бупивакаин, F3, амитриптилин, QX-314, нортриптилин	этанол, ФИФ ₂
$K_{ir3.3}$	-	ФИФ ₂
$K_{ir3.4}$	4-АП ¹ , ТЭА ¹ , амитриптилин, NIP-142, AZD2927, нортриптилин	этанол, ФИФ ₂ , арахидоновая кислота
$K_{ir4.1}$	нортриптилин	-
$K_{ir4.2}$	-	-
$K_{ir5.1}$	-	-
$K_{ir6.1}$	глибенкламид, толбутамид	диазоксид, пинацидил, никорандил, миноксидил
$K_{ir6.2}$	глибенкламид, толбутамид	диазоксид, пинацидил, никорандил, кромакалин, миноксидил
$K_{ir7.1}$	ML-111, VU573	-
K_{2p}		
$K_{2p1.1}$	-	-
$K_{2p2.1}$	хинидин ¹	рилузол, арахидоновая кислота, галотан
$K_{2p3.1}$	анандамид	галотан, изофлуран
$K_{2p4.1}$	-	арахидоновая кислота, рилузол
$K_{2p5.1}$	лидокаин, хинидин	Галотан
$K_{2p6.1}$	хинидин	арахидоновая кислота
$K_{2p9.1}$	рутениевый красный, анандамид	Галотан
$K_{2p10.1}$	хинидин	арахидоновая кислота, рилузол, галотан, изофлуран
$K_{2p13.1}$	галотан	арахидоновая кислота
$K_{2p16.1}$	хинидин, хлороформ	Изофлуран
$K_{2p17.1}$	хлороформ	местные анестетики
$K_{2p18.1}$	хинидин	местные анестетики
K_v		
$K_v1.1$	ТЭА, 4-АП, дилтиазем, капсаицин, флекаинид, резинифератоксин, нифедипин	-
$K_v1.2$	ТЭА, 4-АП, дилтиазем, капсаицин, флекаинид, резинифератоксин, нифедипин, анандамид	-
$K_v1.3$	ТЭА, 4-АП, корреолид ² , РАР-1, налтрексон, CP339818, дилтиазем, резинифератоксин, нифедипин, верапамил, хинин, UK78282, капсаицин, H37	-
$K_v1.4$	ТЭА, 4-АП, UK78282, рилузол, хинидин, никардипин, CP339818	-
$K_v1.5$	ТЭА, 4-АП, AVEO118, S9947, флекаинид, хинидин, дилтиазем, резинифератоксин,	-

K⁺ канал	Блокаторы	Активаторы
	нифедипин, бупивакаин	
K _v 1.6	ТЭА, 4-АП	-
K _v 1.7	ТЭА, 4-АП, флекаинид, хинидин, верапамил, амиодарон, флекаинид, дилтиазем, резинифератоксин, нифедипин, СР-339818, капсаицин, тедисамил, хромакалим	-
K _v 1.8	ТЭА, 4-АП, кетоконазол, пимозид, верапамил	цГМФ
K _v 2.1	ТЭА, 4-АП, галотан, RY796, DAVCO-C ₁₆	линолевая кислота
K _v 2.2	ТЭА, 4-АП, хинин, фенциклидин, RY796, хинин	-
K _v 3.1	ТЭА, 4-АП, флекаинид, дилтиазем, резинифератоксин, нифедипин, хромакалим, капсаицин	-
K _v 3.2	ТЭА, 4-АП, верапамил, 8-бромо-цГМФ	-
K _v 3.3	ТЭА, 4-АП	-
K _v 3.4	ТЭА, 4-АП, DAVCO-C ₁₆ , DAVCO	-
K _v 4.1	ТЭА, 4-АП	-
K _v 4.2	ТЭА, 4-АП, арахидоновая кислота	-
K _v 4.3	4-АП, никотин, рилузол, сибутрамин, бупивакаин	-
K _v 7.1	ХЕ-991 ² , линопирдин, L735821, хроманол 293Б, мефлохин, Iks124, HMR-1556, азимилид	L364373, мефенамовая кислота, нифлумовая кислота, ML277, R-L3, пиритион цинка
K _v 7.2	ТЭА, ХЕ-991, линопирдин, L735821	ретигабин ² , BMS204352, S-1, пиритион цинка, ztz240, ICA-27243, QO-58
K _v 7.3	ТЭА, ХЕ-991, линопирдин, бепридил	ретигабин, BMS204352, диклофенак ²
K _v 7.4	ТЭА, ХЕ-991, линопирдин, бепридил	ретигабин, BMS204352, S-1, пиритион цинка, ML213, NC00075159
K _v 7.5	ТЭА, ХЕ-991, линопирдин	ретигабин, BMS204352, S-1, пиритион цинка
K _v 10.1	ICA-105574, LY97241, хинидин, терфенадин, дофетилид, астемизол, E4031, галоперидол, МК-499	-
K _v 10.2	хинидин, LY97241	-
K _v 11.1	астемизол, E4031, сертиндол, дофетилид, терфенадин, ибутилид, цизаприд, AZD3778, дизопирамид	маллотоксин ² , RPR260243, A-935142, PD-118057, PD-307243, ICA-105574, NS1643, VU0405601, KB-130015, NS3623
K _v 11.2	сипатригин, E4031	NS1643
K _v 11.3	сертиндол, пимозид, E4031	NS1643
K _v 12.1	-	-
K _v 12.2	-	-
K _v 12.3	-	-
BK_{Ca}		
K _{Ca} 1.1	ТЭА, паксиллин ²	NS1608 ² , NS1619, BMS204352, DHS-1, эстрадиол
K _{Ca} 4.1	ТЭА, хинидин, бепридил	битионол, локсапин, никлозамид, NS004, NS1619
K _{Ca} 4.2	ТЭА, хинидин, АТФ	нифлумовая кислота, NS004, NS1619
K _{Ca} 5.1	ТЭА, хинидин	NS004, NS1619
SK_{Ca}		
K _{Ca} 2.1	UCL1684 ² , NS8593, флуоксетин, d-тубокурарин ¹ , деквалин, UCL1848	NS309 ² , DC-EBIO, рилузол, EBIO
K _{Ca} 2.2	UCL1684, NS8593, d-тубокурарин, деквалин, UCL1848	NS309, DC-EBIO, рилузол, EBIO, СуРРА, хлорзоксазон
K _{Ca} 2.3	UCL1684, NS8593, деквалин, UCL1848, NS11757	NS309, DC-EBIO, рилузол, EBIO, СуРРА
K _{Ca} 3.1	TRAM-3, TRAM-34, ICA-17043, клотримазол, нитрендипин	NS309, DC-EBIO, рилузол, EBIO, SKA-31, SKA-121, хлорзоксазон

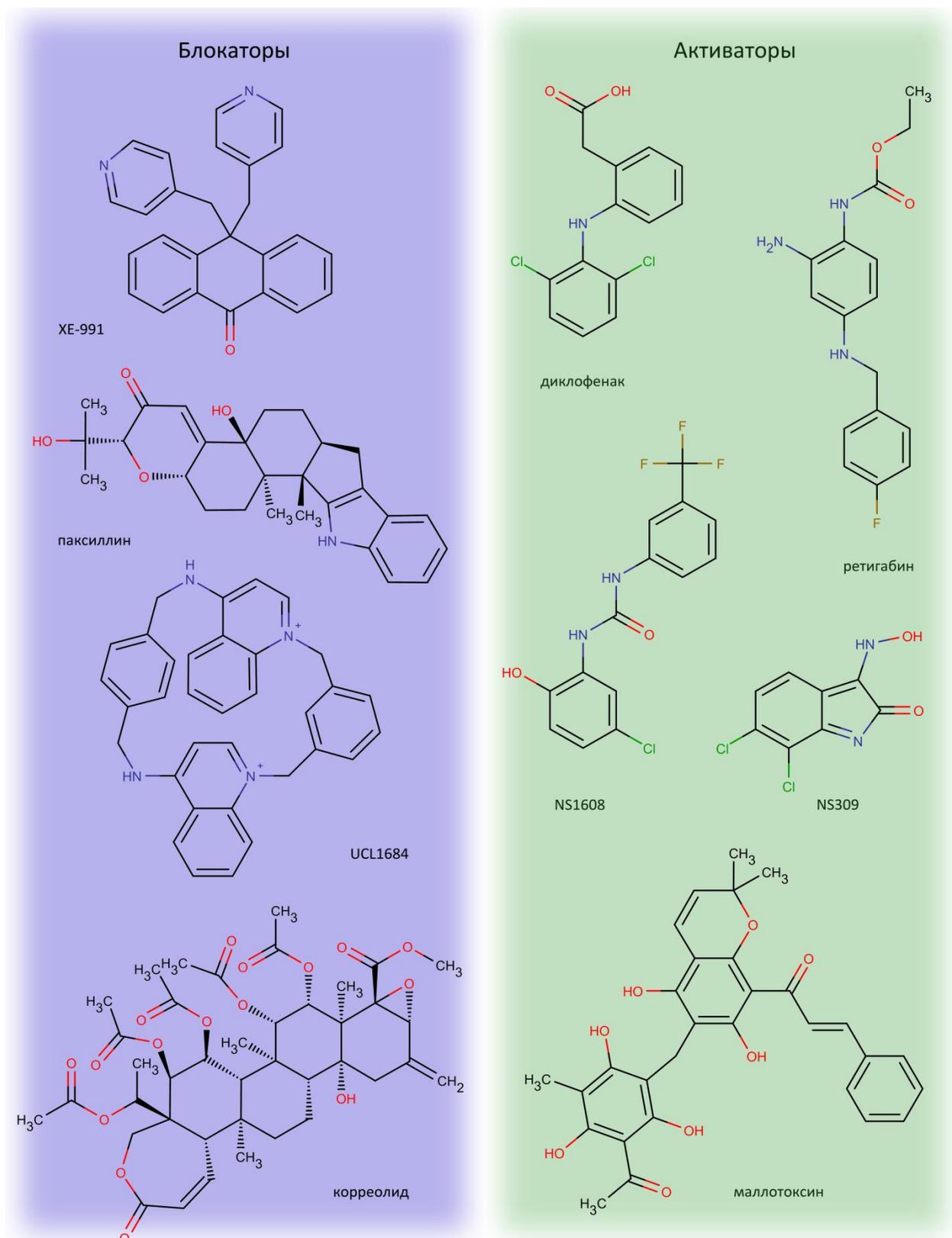


Рисунок 12. Некоторые низкомолекулярные блокаторы и активаторы K^+ каналов.

3.2.2 Полипептидные токсины

Большое количество полипептидных лигандов K^+ каналов было идентифицировано в яде целого ряда животных, таких как пчелы, змеи, морские анемоны, улитки конусы, пауки и скорпионы. Эти вещества, часто называемые токсинами, синтезируются в ядовитых железах в виде предшественников, которые в результате процессинга превращаются в активные молекулы (183, 184).

В настоящее время описано огромное количество ядовитых животных, но яды лишь немногих изучались, а детальную характеристику получили только некоторые из них. Это связано с тем, что яды представляют собой сложные смеси множества компонентов, изучение которых может занимать несколько десятков лет (185, 186). Существуют две основные стратегии в исследовании яда (**Рисунок 13**): первая, традиционная, основывается на непосредственной работе с ядом и выделением из него активных соединений с помощью различных хроматографических методов (187); вторая, более молодая, сопряжена со стремительным развитием технологий секвенирования ДНК и базируется на конструировании и анализе библиотек кДНК на основе мРНК из ядовитых желез животного (188, 189).

Для реализации первой стратегии необходимо достаточное количество цельного яда, полученного из ядовитых желез, например, электростимуляцией. Яд подвергают серии хроматографических разделений: на начальных стадиях обычно используют эксклюзионную хроматографию, а затем полученные фракции разделяют с помощью нескольких раундов ионообменной и/или обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ). И наконец, полипептидные компоненты, выделенные в индивидуальном состоянии, секвенируют посредством *N*-концевой ступенчатой деградации по Эдману (190).

Часто основными действующими компонентами яда животных являются пептиды. Их первичная структура может быть установлена в результате секвенирования мРНК, выделенной из ядовитых желез. На основе этих мРНК с помощью обратной транскрипции получают соответствующую кДНК и секвенируют ее. После этого анализируют всю библиотеку кДНК или отдельные последовательности. С помощью трансляции *in silico* получают аминокислотные последовательности, а соответствующие им пептиды производят химическим синтезом или в рекомбинантных системах (191). Богатая информация может быть получена в результате секвенирования всего генома ядовитых животных, однако в настоящее время полноразмерные геномы расшифрованы лишь для ограниченного числа видов (192–195).

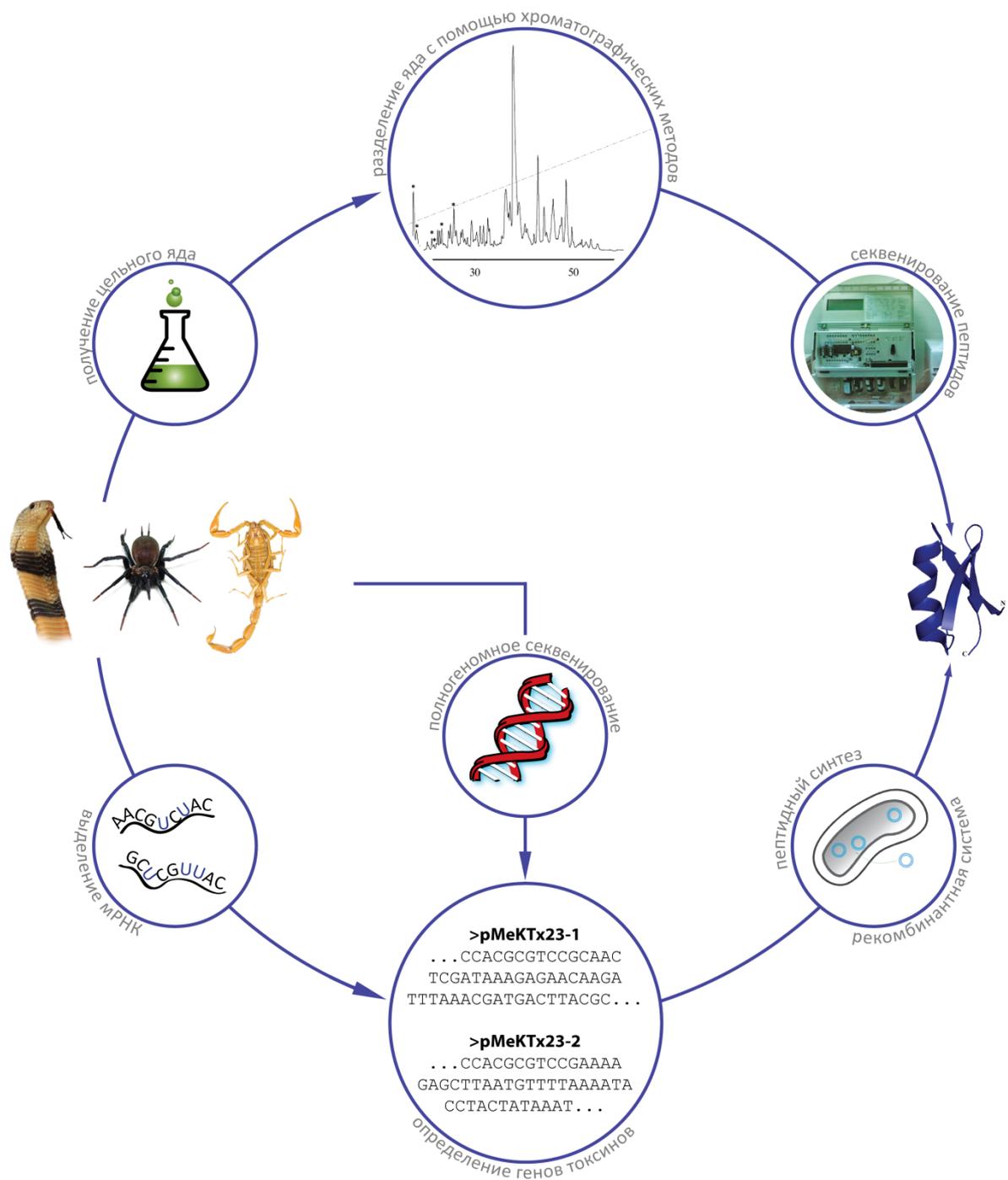


Рисунок 13. Основные стратегии идентификации активных пептидов в яде животных. Первая основывается на работе с цельным ядом и непосредственном выделении из него активных компонентов, вторая предполагает исследование компонентов яда посредством конструирования библиотек кДНК из мРНК ядовитых желез и последующего получения интересующих молекул химическим синтезом или в рекомбинантных системах.

Традиционные подходы поиска и характеристики лигандов K^+ каналов основываются на электрофизиологических измерениях (методы локальной или двухэлектродной фиксации потенциала) (196, 197) или на радиолигандном анализе (198,

199). При использовании электрофизиологических методов измерения проводятся на искусственных мембранах, эукариотических клетках или ооцитах лягушки *Xenopus laevis*, экспрессирующих гены канальных белков. В радиолигандном анализе используются меченные радиоактивными изотопами лиганды к определенным каналам, а активность исследуемых образцов анализируется по вытеснению ими радиоактивных меток из комплекса. В последнее время широкое развитие получили подходы, основанные на использовании флуоресцентно-меченых лигандов вместо лигандов с радиоактивной меткой (200). Исследователи используют такие методы как флуоресцентная проточная цитометрия (201) и флуоресцентная микроскопия отдельных молекул (202).

Группы животных, в ядах которых в настоящее время идентифицированы лиганды K^+ каналов, далее будут рассматриваться в следующем порядке: позвоночные, морские беспозвоночные и наземные беспозвоночные.

3.2.2.1 Змеи

В настоящее время известно порядка 2650 видов змей, из которых 500 считаются ядовитыми (203). Наиболее опасные представители относятся к семейству Viperidae (гадюки и гремучие змеи) и Elapidae (кобры и крайты) (204). В состав яда змей входит широкое разнообразие биоактивных компонентов: ферменты, полипептиды с антикоагулянтной, гемолитической, гипотензивной и прочими активностями, а также другие органические молекулы, например, нуклеотиды (205). Среди этого многообразия найдены полипептидные токсины, воздействующие на мембранные белки, в частности K^+ каналы (206). Блокаторы K^+ каналов были обнаружены в яде змей рода *Dendroaspis* (мамбы) и получили название дендротоксинов (**Рисунок 14**) (207). Это молекулы, состоящие из 57-60 аминокислотных остатков (**Таблица 2**), шесть из которых остатки цистеина, и формирующие в пространстве укладку типа Кунитца. Расположение дисульфидных связей следующее: C^1-C^6 , C^2-C^4 и C^3-C^5 (208). Для дендротоксинов было отмечено наличие только одной посттрансляционной модификации – циклизации *N*-концевого глутамина в пироглутамат.

Дендротоксины активны по отношению к K_v каналам ($K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v1.6$) и действуют в диапазоне от пико-/наномолярных концентраций (209, 210).



Рисунок 14. А – змея *Dendroaspis polylepis* (фотография использована с разрешения правообладателя Гюнтера Лайтенбауера, <http://www.leitenbauer.net/>), Б – пространственная структура блокатора K_v каналов I-DTX (PDB ID: 1DEM), выделенного из яда этой змеи.

Таблица 2. Основные представители токсинов змей, действующих на K^+ каналы. # – код в базе данных UniProt. Z – остаток пироглутаминовой кислоты. Здесь и далее цифрами будет обозначаться активность по отношению к различным K^+ каналам. 1 – активность в отношении K_v (кроме K_v11 каналов). Остатки цистеина выделены полужирным шрифтом.

Токсин	ID [#]	Аминокислотная последовательность	Активность
<i>Dendroaspis angusticeps</i>			
α -DTX	P00980	ZPRRKL C ILHRNPGR C YDKIPAFYYNQKKK Q CE ^R FDWSGCGGNSNRFKTIEE CR RT C IG	1
δ -DTX	P00982	AAKY C KL P VRYG P CKKKI P SFY Y KWKA K Q C LPFDYSGCGGNANRFK T IEE CR RT C VG	1
E-DTX	P00984	LQHRT F CK L PAE P GP C KASIPAFYYN W AAK K Q L FHYGG C KGNANRFSTIE K CR H AC V G	1
<i>Dendroaspis polylepis polylepis</i>			
I-DTX	P00979	ZLRK L CILHRNPGR C YQ K IPAFYYNQKK Q CEGFTWSGCGGNSNRFKTIEE CR RT C IR K	1
B-DTX	P00983	RPY A CEL I VAA G PC M FFISAFY Y SKGANK C YPFT Y SGCRGNANRFK T IEE CR RT C VV	1
K-DTX	P00981	AAKY C KL P LRIG P CKR K IPSFY Y KWKA K Q C LPFDYSGCGGNANRFK T IEE CR RT C VG	1

3.2.2.2 Морские анемоны

Морские анемоны, также называемые актиниями (Actiniaria), принадлежат к классу коралловых полипов (Anthozoa). Большинство представителей – одиночные сидячие организмы, обитающие на твердом морском грунте (211).

Цельный яд морских анемонов – это, как и в случае со змеями, смесь множества компонентов: актинопоринов (~20 кДа), формирующих поры в липидном бислое (212), лигандов потенциал-зависимых Na^+ каналов (213), блокаторов K^+ каналов (214) и других полипептидов, например, лигандов кислоточувствительных каналов (215) и терморцепторов (216).

В настоящее время известно более 25 полипептидов из яда анемонов, действующих на K^+ каналы (217). В структурном отношении все эти молекулы можно разделить на три группы (218). К первой принадлежат полипептиды AeK, BgK, HmK и ShK, состоящие из 34-37 аминокислотных остатков, шесть из которых – остатки цистеина, а расположение

дисульфидных связей следующее: C¹–C⁶, C²–C⁴ и C³–C⁵ (214, 219–221). В результате в пространстве формируются структуры, представленные комбинацией α- и/или 3₁₀-спиралей (**Рисунок 15**) (204). Вторая группа включает молекулы AsKC1 и APETx1, имеющие 58-65 аминокислотных остатков, шесть из которых цистеины, а расположение

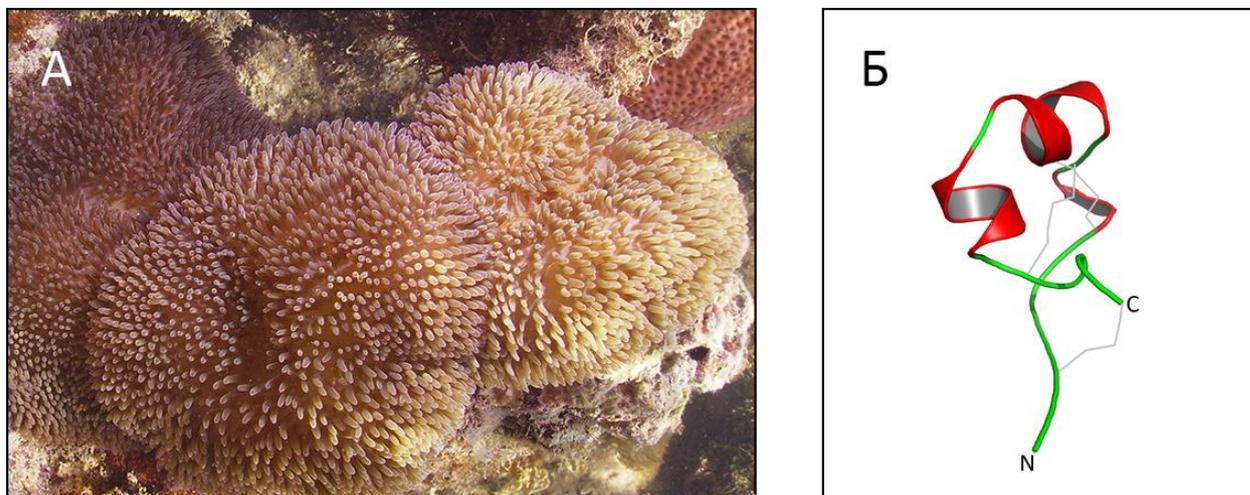


Рисунок 15. А – морская анемона *Stichodactyla helianthus* (фотография использована с разрешения правообладателя Хайди Хертлер), Б – пространственная структура высокоаффинного блокатора K⁺ каналов ShK (PDB ID: 1ROO), выделенного из этой анемоны.

Таблица 3. Основные представители токсинов морских анемонов, действующих на K⁺ каналы. 1, 4, 5 – активность в отношении K_v (кроме K_v11 каналов), IK_{Ca} и K_v11 каналов, соответственно. О – остаток 4-гидроксипролина, остатки цистеина выделены полужирным шрифтом. -NH₂ обозначает амидирование.

Токсин	ID	Аминокислотная последовательность	Активность
		<i>Actinia equina</i>	
AeK	P81897	GCKDNFSANT CK HVKANNN CG SQKYATN CA KT CG KC	1
		<i>Anemonia erythraea</i>	
AETX K	Q0EAE5	ACKDYLPKSE CT QFR CR TS SM KYKYTN CK KT CG TC	1
		<i>Anemonia sulcata</i>	
BDS-I	P11494	AAP CF CSGKPGRGDLWILRG TC PGGYGYTSN CY KWPNI CC YPH	1
AsKS	Q9TWG1	ACKDNFAAAT CK HVKENKN CG SQKYATN CA KT CG KC	1
AsKC1	Q9TWG0	INKD CL L PM DVGR CR ASHPRYYN SS SK RC EKFIYGG CR GNANN FH T LE E CE K VC GV R	1
		<i>Antheopsis maculata</i>	
Am II	P69930	ALL SC RC EG KTEYGD KW LFHGG CO NNYGYNY KC FMKPGAV CC YPQNGR-NH ₂	5
		<i>Anthopleura elegantissima</i>	
APETx1	P61541	GT TC Y CG KTIGIYWFG TK TCPSNRGYTG SC GYFLGI CC YPVD	5
		<i>Bunodosoma caissarum</i>	
BcsTx1	C0HJC2	ACIDRFPTGT CK HVKKGG SC KNSQKYRIN CA KT CG L CH	1
		<i>Bunodosoma granuliferum</i>	
BgK	P29186	VCRDWFKETACRHAKSLGN CR TSQKYRAN CA KT CE LC	1, 4
		<i>Cryptodendrum adhaesivum</i>	
κ-TATX	E2S064	RTCIDTIPK SRC TAF Q CKNSMKYRL SF CRK TC GT C	1
		<i>Heteractis magnifica</i>	
HmK	O16846	RT CK D LI PVSE CT DIR CR TS SM KYRLN LC RK TC GS C	1
		<i>Stoichactis helianthus</i>	
ShK	P29187	R SC IDTIPK SRC TAF Q CKH SM KYRL SF CRK TC GT C	1, 4

дисульфидных связей следующее: C¹–C⁶, C²–C⁴ и C³–C⁵ (222, 223). Пространственная структура таких полипептидов представлена укладкой типа Кунитца (218). Наконец,

молекулы третьей группы блокаторов K^+ каналов из яда анемон (BDS-I, Am II и APETx1) состоят из 42-48 аминокислотных остатков, также имеют три дисульфидные связи, но располагаются они следующим образом: C^1-C^5 , C^2-C^4 и C^3-C^6 (224–226). Пространственная укладка полипептидов данной группы образована несколькими β -тяжами (204). Аминокислотные последовательности некоторых блокаторов приведены в **Таблице 3**. У активных полипептидов из яда морских анемон иногда встречаются посттрансляционные модификации, такие как образование 4-гидроксипролина из пролина, а также амидирование С-концевого аминокислотного остатка (225). Как правило, полипептиды из яда актиний действуют на K_v каналы, в том числе на K_v11 и $K_v3.4$ (224, 226), а также на IK_{Ca} (227) в пико- и наномолярных концентрациях.

3.2.2.3 Конусы

Конусы – хищные морские моллюски из семейства Conidae, включающего порядка 600 видов (228). Главное оружие конусов – короткие дисульфид-содержащие пептиды, которые получили название конопептидов (229).

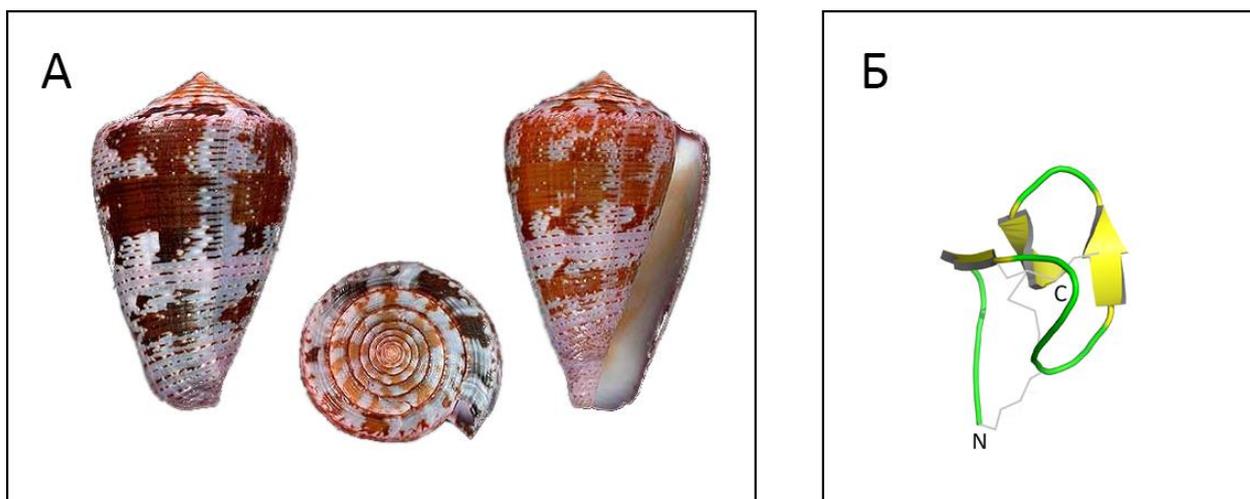


Рисунок 16. А – конус *Conus purpurascens* (фотография использована с разрешения правообладателя Пей Джан Ванга), Б – пространственная структура блокатора K_v каналов κ -PVIIA (PDB ID: 1AV3), выделенного из яда этого моллюска.

Конопептиды, действующие на K^+ каналы (κ -конотоксины), весьма разнообразны, и их можно разделить на несколько групп согласно первичной структуре (230). Аминокислотные последовательности некоторых блокаторов приведены в **Таблице 4**. κ A-Конотоксины (Ac4.2, MIVA, PIVF, SmIVA, SIVA и другие) – пептиды, состоящие из 24-37 аминокислотных остатков, шесть из которых – остатки цистеина, формирующие мотив $SS-C-C-C-C$. Дисульфидные связи могут располагаться двумя способами: C^1-C^5 , C^2-C^3 и

C^4-C^6 или C^1-C^3 , C^2-C^5 и C^4-C^6 (231–233). кО-Конотоксины (например, PVIIA) – короткие (~27 аминокислотных остатков) пептиды, также имеющие шесть остатков цистеина, но их расположение отличается от кА-конотоксинов: C-C-CC-C-C. Расположение дисульфидных связей следующее: C^1-C^4 , C^2-C^5 и C^3-C^6 (Рисунок 16) (234, 235). кМ-Конотоксины (RIIIJ и RIIIK) состоят примерно из 24-25 аминокислотных остатков, а количество цистинов и расположение дисульфидных связей такое же, как у кО-конотоксинов. Однако остатки цистеина у них расположены иначе и формируют мотив CC-C-C-CC (236, 237). Еще одна группа, кI-конотоксины (BeTx, SrXIA и ViTx), представлена молекулами, состоящими из ~30 аминокислотных остатков (восемь остатков цистеина образуют четыре дисульфидные связи, замыкающиеся различными способами). В данном случае остатки цистеина формируют мотив C-C-CC-CC-C-C (238–241). Встречаются в яде конусов и конопептиды, действующие на K^+ каналы, с двумя дисульфидными связями – это кL-конотоксины (vill4a) и кJ-конотоксины ($\alpha/k-pl14a$). Расположение остатков цистеина у них одинаковое: C-C-C-C, а вот расположение дисульфидных связей разное: C^1-C^4 , C^2-C^3 для кL и C^1-C^3 , C^2-C^4 для кJ (242, 243). Кроме того, стоит отметить еще две интересные молекулы: конкунитцин-S1 (Conk-S1), имеющий укладку типа Кунитца при всего двух дисульфидных связях (C^1-C^4 , C^2-C^3) (244), а также контрифан-Vn (Con-Vn), конотоксин, состоящий из десяти аминокислотных остатков и имеющий одну дисульфидную связь (245). Такая вариация расположения остатков цистеина и дисульфидных связей влечет за собой широкое разнообразие типов пространственной укладки к-конотоксинов. Это может быть «цистиновый узел» (ICK, см. ниже), как в случае PVIIA (235), укладка типа Кунитца (246) и даже мотив спираль-петля-спираль (242).

В молекулах как к-конотоксинов, так и других пептидов из яда конусов очень часто встречаются посттрансляционные модификации, некоторые из которых редко обнаруживаются у других организмов (247). Наравне с циклизацией N-концевого глутамина, образованием гидроксипролина и C-концевым амидированием, встречающимися у токсинов других животных, можно обнаружить такие модификации, как образование остатков 4-карбоксиглутамата, O-гликозилирование серина и треонина (248), а также включение в состав полипептидной цепи D-аминокислот, например D-триптофана (249). Основной мишенью к-конотоксинов являются K_v каналы, но для некоторых молекул отмечены эффекты на VK_{Ca} каналы (230).

Таблица 4. Основные представители конотоксинов, действующих на K^+ каналы. 1, 2 – активность в отношении K_v (кроме K_{v11} каналов) и BK_{Ca} каналов, соответственно. O – остаток 4-гидроксипролина, Z – остаток пироглутаминовой кислоты, E – остаток 4-карбоксихлутамата, T и S – O-гликозилированные аминокислотные остатки, W^D – остаток D-триптофана. Остатки цистеина выделены полужирным шрифтом. -NH₂ обозначает амидирование.

Токсин	ID	Аминокислотная последовательность	Активность
<i>Conus achatinus</i>			
κ-Ac4.2	A3DT44	AOWMVVTA <u>T</u> TNCCGYTGPA <u>C</u> HOCLCTQSC-NH ₂	1
<i>Conus betulinus</i>			
BeTx	Q9U3Z3	CRAEGTYC <u>E</u> ND <u>S</u> QCCLNE <u>C</u> WGGCGHOCRHP-NH ₂	2
<i>Conus magus</i>			
κ-MIVA	P0C1X1	AO <u>E</u> LVVTA <u>T</u> TNCCGYNOMTIC <u>O</u> OC <u>M</u> CTYSC <u>O</u> OKRKO-NH ₂	1
<i>Conus monile</i>			
κ-Mo1659	P84713	FHGGSWYRFPWGY-NH ₂	1
<i>Conus planorbis</i>			
α/κ-pl14a	Q0N4U8	FPRPRICNLACRAGIGHKYPF <u>C</u> HCR-NH ₂	1
<i>Conus purpurascens</i>			
κ-PIVF	P0C2C6	DCCGVKLEM <u>C</u> HPCLCDNSCKKSGK-NH ₂	1
κ-PVIA	P56633	CRIONQK <u>C</u> FQHLDD <u>C</u> SRKCNRFNKCV	1
<i>Conus radiatus</i>			
κ-RIIIJ	P0CG45	LOCC <u>T</u> OOKKHCOAOAC <u>K</u> YK <u>O</u> CC <u>K</u> S	1
κ-RIIIK	P69769	LO <u>C</u> CSLNLRLCOVOAC <u>K</u> RNOCC <u>T</u> -NH ₂	1
<i>Conus spurius</i>			
κ-SrXIA	P0C615	CRTEGMS <u>C</u> EENQ <u>Q</u> CC <u>W</u> RS <u>C</u> CRGECEAPCRFGP-NH ₂	1
<i>Conus stercusmuscarum</i>			
κ-SmIVA	P0CE75	ZTWLVPS <u>T</u> IT <u>T</u> CCGYDOGTM <u>C</u> OT <u>C</u> MDNTCKOKKKS-NH ₂	1
<i>Conus striatus</i>			
κ-SIVA	P0C828	ZKSLVPS <u>V</u> IT <u>T</u> CCGYDOGTM <u>C</u> OO <u>C</u> RC <u>T</u> NS <u>C</u> -NH ₂	1
Conk-S1	P0C1X2	KDRPSL <u>C</u> DLPADSGSGTKAEKRIYNSARKQ <u>C</u> LRFDYTGQGGNENFRRTYDC <u>Q</u> RT <u>C</u> LYT-NH ₂	1
<i>Conus ventricosus</i>			
Con-Vn	P83047	GDCPW ^p <u>K</u> PW <u>C</u> -NH ₂	1, 2
<i>Conus villepini</i>			
κ-vil14a	P84704	GGLGR <u>C</u> IY <u>N</u> CMNSGGLSFI <u>Q</u> CK <u>T</u> MCY	1
<i>Conus virgo</i>			
κ-ViTx	Q7YZS9	SRCFPPGIYCTPYLP <u>C</u> CGWGI <u>C</u> CGTCRNV <u>C</u> HLRI-NH ₂	1

3.2.2.4 Пчелы

Яд пчел изучен достаточно хорошо, а такие его компоненты, как мелиттин, секапин, апамин и тертиапин, уже стали классическими инструментами в разного рода исследованиях (**Рисунок 17**) (250). Апамин и тертиапин – два коротких пептида, состоящие из 18 и 21 аминокислотного остатка, они действуют на различные K^+ каналы (**Таблица 5**) (251, 252). Их молекулы имеют посттрансляционную модификацию – амидированный C-концевой аминокислотный остаток; четыре остатка цистеина образуют две дисульфидные связи, располагающиеся следующим образом: C^1-C^3 , C^2-C^4 , а в пространстве формируется структура, имеющая короткий β-поворот и α-спираль (253–255). Блокирующий эффект апамина направлен преимущественно на SK_{Ca} каналы (256, 257), в то время как тертиапин действует на BK_{Ca} (258) и K_{ir} каналы (259, 260).

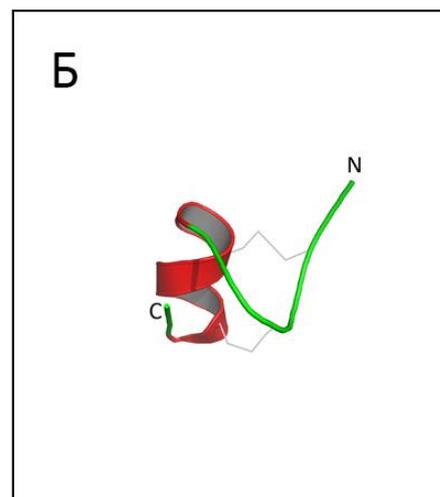


Рисунок 17. А – медоносная пчела *Apis mellifera* (фотография использована с разрешения правообладателя Александра Вайлда, <http://www.alexanderwild.com/>), Б – пространственная структура пептидного лиганда K^+ каналов – тертиапина (PDB ID: 1TER), выделенного из яда пчелы.

Таблица 5. Основные представители коротких полипептидов из яда пчел, действующих на K^+ каналы. 2, 3, 6 – активность в отношении VK_{Ca} , SK_{Ca} и K_{ir} каналов, соответственно. Остатки цистеина выделены полужирным шрифтом. $-NH_2$ обозначает амидирование.

Токсин	ID	Аминокислотная последовательность	Активность
<i>Apis mellifera</i>			
Апамин	P01500	СНСКАР Е TALCARR С QQH-NH ₂	3
Тертиапин	P56587	ALCNCNRI I I PHMCW К К С Г К К-NH ₂	2, 6

3.2.2.5 Пауки

В настоящее время известно порядка 45 000 видов пауков (261), но из всего этого многообразия исследовались яды примерно ста видов (262), а детальную характеристику получили лишь некоторые (263). Яды пауков – сложные смеси биологически активных веществ, компоненты которых можно разделить на три группы: низкомолекулярные (<1 кДа) вещества разнообразного строения, пептиды (1–10 кДа) и высокомолекулярные (>10 кДа) вещества – ферменты и нейротоксины (262). Молекулы, действующие на K^+ каналы, относятся ко второй группе, а по механизму действия, как правило, являются ингибиторами активации каналов, реализуя свой эффект через взаимодействие с сенсором потенциала (264). Подобные токсины частично встраиваются в мембрану за счет гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности, а затем взаимодействуют с сенсором потенциала и ингибируют активацию канала (265). Эти токсины состоят из ~30–40 аминокислотных остатков (Таблица 6), а расположение дисульфидных связей у них следующее: C^1-C^4 , C^2-C^5 и C^3-C^6 (88, 266–268). Пространственная структура представлена укладкой типа «цистиновый узел» (ICK), характеризующейся наличием β -шпильки и своеобразного «узла» (отсюда название): третья по счету дисульфидная связь

(C³–C⁶) пронизывает кольцо, образованное двумя другими дисульфидами и атомами основной цепи, их соединяющими (**Рисунок 18**) (262). В случае некоторых полипептидов (κ-HXTX и PNTx3-1) присутствует четвертая дисульфидная связь, но она является добавочной и принципиально не влияет на тип пространственной укладки молекул (269). Кроме того, в яде пауков найдены лиганды K⁺ каналов с пространственной укладкой типа Кунитца, которые выступают в роли слабых поровых блокаторов (270).



Рисунок 18. А – чилийский птицеяд *Grammostola rosea* (фотография использована с разрешения правообладателей Ольги Натальской и Даниила Осипова), Б – пространственная структура ханатоксина (PDB ID: 1D1H), выделенного из яда этого паука.

Таблица 6. Основные представители токсинов пауков, действующих на K⁺ каналы. 1, 2, 5 – токсины, активные на K_v, BK_{Ca} и K_v11 каналы, соответственно. Остатки цистеина выделены полужирным шрифтом. -NH₂ обозначает амидирование.

Токсин	ID	Аминокислотная последовательность	Активность
<i>Chilobrachys guangxiensis</i>			
JZTX-I	P83974	ACGQF W W K CGEGK P P CC ANF A CKIGLYLCI W SP	1
JZTX-III	P62520	DG E CGGF W W K CGRGK P P CC KGYACSKTWG W CAVEAP	1
JZTX-V	Q2PAY4	YCQ K W M W T CDSK R AC CE GL R CKL W CR K II-NH ₂	1
<i>Grammostola rosea</i>			
HaTx1	P56852	ECRYLFGG C KTTSD CC KHLG CK FRDKYCA W DF T ES	1
VsTx1	P60980	ECG K FM W CKNSND CC KDLV C SSRW K W C VLAS P F	5
GsMTx4	Q7YT39	GCLE F W W CKNPND DK CC R PK L CK S KL F KL C NFS F -NH ₂	5
GsAFII	P61409	YCQ K W M W T CDEER K CC E GL V CRL W CK K K I EW	5
<i>Hadronyche versuta</i>			
κ-HXTX	P82227	T I CTGAD R PC AA CC P CC P GT S CQ G PESNGVVY C R N F	2
<i>Haplopelma schmidti</i>			
HwTx-XI	P68425	ID T CRL P SD R GR CK AS F ERW Y FNG R T CA K F I Y GG C GNG N K F P T Q E AC M K R CA KA	1
<i>Heteropoda venatoria</i>			
HpTX1	P58425	DCG T I W H Y CG T DQ S E CC E G W K CS R QL CK Y V ID W -NH ₂	1
<i>Heteroscodra maculata</i>			
HmTx1	P60992	ECRYLFGG C S T SD CC KHL S CR S D W K Y CA W D G T F S	1
<i>Paraphysa scrofa</i>			
PaTX1	P61230	YCQ K W M W T CDS A R K CC E GL V CRL W CK K II-NH ₂	1
<i>Phoneutria nigriventris</i>			
PNTx3-1	O76200	A E CA A V Y ER CG K G Y K RC CE ER P CK C NI V MD N CT CK K F ISE	1
<i>Psalmopoeus cambridgei</i>			

Токсин	ID	Аминокислотная последовательность	Активность
VaTx1	P0C244	SECRWFMGGCDSTLDCCCKHLSCKMGLYYCAWDGTF-NH ₂ <i>Stromatopelma calceatum griseipes</i>	1
SGTx1	P56855	TCRYLFGGCKTTADCCCKHLACRSDDGKYCAWDGTF	1
ScTx1	P60991	DCTRMFGACRRDSDCCPHLGCKPTSKYCAWDGTI-NH ₂ <i>Theraphosa blondi</i>	1
TITx1	P83745	AACLGMFESCDPNNDKCCPNRECNRKHKWCKYKLV <i>Thrixopelma pruriens</i>	1
ProTx1	P83480	ECRYWLGGSAGQTCCCKHLVCSRRHGWCVWDGTFS	1

Токсины пауков действуют в основном на K_v каналы: ханатоксин (HaTx1) активен по отношению к K_v2.1 (88), HpTx1 и PaTx1 – на K_v4 каналы (267, 271), ScTx1 и HmTx1 – на K_v2 и K_v4 (272). Некоторые соединения, например, JZTX-I и VsTx1, показывающие активность на спектр потенциал-зависимых ионных каналов (Na⁺, Ca²⁺), могут также ингибировать и K⁺ каналы (273–275).

3.2.2.6 Скорпионы

Огромную роль в изучении и понимании механизма работы, а также физиологической роли K⁺ каналов сыграли полипептидные блокаторы из яда скорпионов (КТх). Интенсивные исследования в этой области начались более 30 лет назад, когда из яда скорпиона *Centruroides noxius* был выделен первый короткий пептид – ноксиустоксин (Рисунок 19) (276), влияющий на калиевый ток в гигантском аксоне кальмара (277). Выделение харибдотоксина (ChTx) из яда скорпиона *Leiurus quinquestriatus hebraeus* (137) и использование его для создания модели лиганд-рецепторного взаимодействия токсинов с каналами позволило достичь значительного успеха в понимании структурно-функциональных особенностей K⁺ каналов (278, 279). В дальнейшем целый ряд селек-

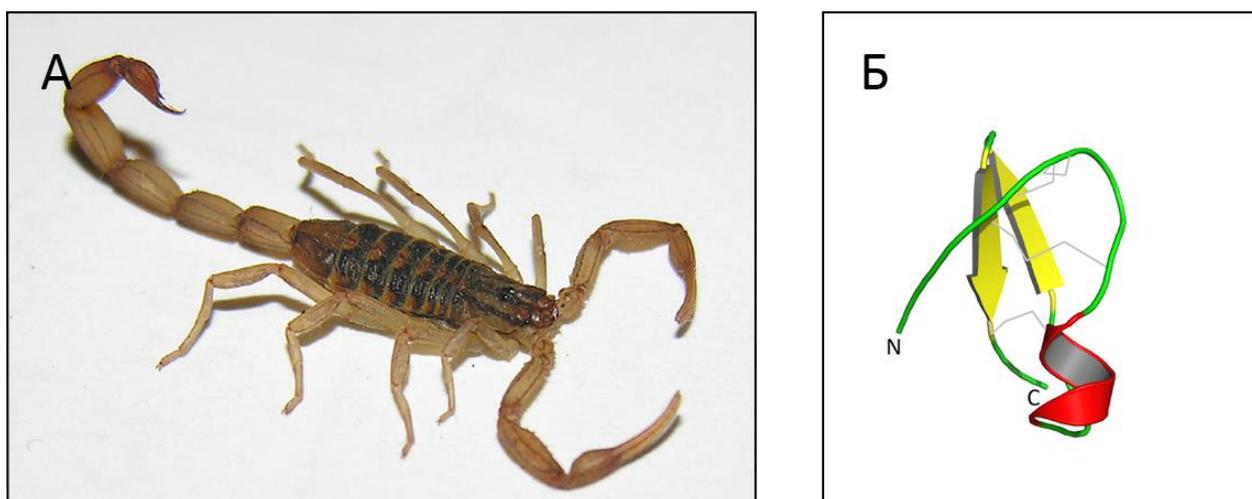


Рисунок 19. А – скорпион *Centruroides noxius* (фотография использована с разрешения правообладателя Джозефа Догерти), Б – пространственная структура ноксиустоксина (PDB ID: 1SXM), выделенного из яда этого скорпиона.

тивных блокаторов некоторых изоформ K^+ каналов был идентифицирован в яде различных скорпионов.

Такие пептиды, как ибериотоксин (280), маргатоксин (281), калиотоксин (282) и агитоксин-2 (283), стали классическими «молекулярными инструментами» в области изучения K^+ каналов (284).

3.2.2.6.1 Структурные особенности блокаторов K^+ каналов из яда скорпионов

Согласно базе данных UniProt известно около 250 блокаторов K^+ каналов из яда скорпионов (КТх). Все они представляют собой небольшие полипептидные молекулы длиной ~20-75 аминокислотных остатков (285, 286) с 2-4 S-S-мостиками, а их молекулярная масса находится в диапазоне ~2400–8500 Да. Биосинтез этих полипептидов осуществляется в виде предшественников, на N-конце которых располагается сигнальный пептид, отщепляющийся во время созревания (287). В ряде случаев сразу за сигнальным пептидом отмечено наличие пропептида с неизвестной функцией, который также отщепляется во время процессинга (288). Некоторые пептиды претерпевают посттрансляционные модификации, такие как преобразование N-концевого глутамина в пироглутаминовую кислоту (289), C-концевое амидирование, образующееся из C-концевого остатка глицина, а также отщепление C-концевых положительно заряженных (лизин, аргинин) аминокислотных остатков (290).

В структурном отношении все блокаторы K^+ каналов из яда скорпионов можно разделить на пять классов (примеры пептидов с тем или иным типом укладки представлены на **Рисунке 20**):

- 1) пептиды, имеющие тип укладки $CS\alpha/\beta$ (цистеин-стабилизированные α -спираль и β -слой). Это самый распространенный фолд среди токсинов скорпионов, он характерен не только для КТх, но также для лигандов Na^+ каналов и группы хлоротоксин-подобных пептидов (291–293);
- 2) КТх, имеющие в своей структуре две параллельные α -спирали, соединенные двумя дисульфидными связями: $CS\alpha/\alpha 2(C-C)$ (285);
- 3) пептиды, по первичной структуре аналогичные представителям первой группы, но имеющие иную третичную структуру: $CS\alpha/\alpha$ (цистеин-стабилизированные спираль-петля-спираль) – в результате альтернативного замыкания дисульфидных связей (294);
- 4) КТх с укладкой типа Кунитца, которая распространена среди ингибиторов сериновых протеаз (295);

5) КТх с укладкой «цистиновый узел» (ICK); такой тип укладки встречается у широкого спектра организмов: растений, грибов, беспозвоночных (296).

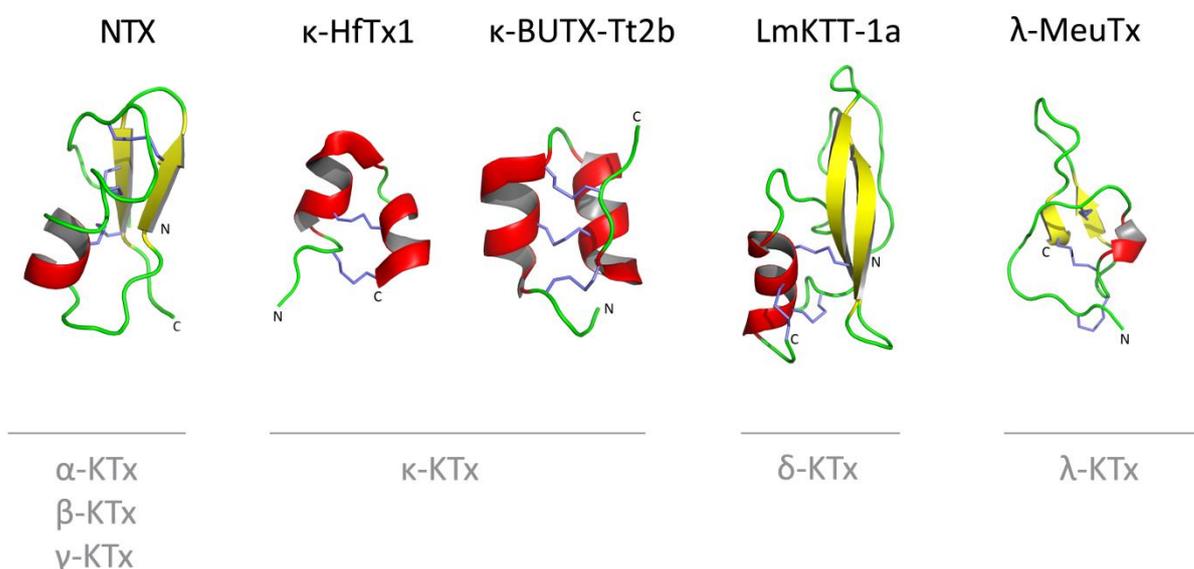


Рисунок 20. Примеры типов пространственной укладки КТх различных групп. NTX – $CS\alpha/\beta$, κ -HfTx1 – $CS\alpha/\alpha$ с двумя дисульфидными связями, κ -BUTX-Tt2b – $CS\alpha/\alpha$ с тремя дисульфидными связями, LmKTT-1a – укладка типа Кунитца, λ -MeuTx – ICK.

Ниже в **Таблице 7** представлена оценка числа известных КТх с тем или иным типом укладки, очевидно, что мотив $CS\alpha/\beta$ является доминирующим (информация взята из базы данных UniProt).

Таблица 7. Распределение КТх по классам согласно структурным особенностям. Общее число описанных пептидов составляет порядка 247.

$CS\alpha/\beta$	$CS\alpha/\alpha$ 2(C-C)	$CS\alpha/\alpha$ 3(C-C)	укладка Кунитца	ICK
220	16	2	7	2
89,2%	6,4%	0,8%	2,8%	0,8%

- КТх с типом укладки $CS\alpha/\beta$

Как уже было отмечено, $CS\alpha/\beta$ – самый распространенный тип укладки среди всех токсинов из яда скорпионов. Его характерной особенностью является наличие в аминокислотной последовательности консервативных мотивов $CXXXC$ и CXC (где C – остаток цистеина, X – любой аминокислотный остаток). В структурно-функциональном отношении КТх с типом укладки $CS\alpha/\beta$ делятся на три семейства: α -КТх, β -КТх и γ -КТх (297).

Семейство α -КТх включает порядка 27 подсемейств (298) согласно сходству аминокислотных последовательностей представителей. В настоящее время известно около 165 полипептидов данного семейства, и их число постоянно растет. α -КТх состоят из ~20-40 аминокислотных остатков, шесть или восемь из которых – остатки цистеина, формирующие три или четыре дисульфидные связи. Большинство известных блокаторов этой группы выделены из яда скорпионов семейства Buthidae, но α -КТх также встречаются среди представителей других семейств (Chactidae, Euscorpidae, Vaejovidae, Carabostonidae, Hemiscorpiidae и Scorpionidae) (299–301).

β -КТх больше по размеру, чем α -КТх, они содержат ~45-75 аминокислотных остатков вследствие наличия удлиненного N-концевого линейного участка. C-Концевой участок содержит шесть остатков цистеина, образующих три дисульфидные связи. Большинство β -КТх идентифицировано в яде скорпионов из семейства Buthidae (22 пептида), два β -токсина были обнаружены в яде *Hadrurus gertschi* из семейства Carabostonidae (286, 302). Считается, что β -КТх, помимо активности на K^+ каналы, обладают еще и цитолитической активностью, реализующейся за счет N-концевого линейного участка (303, 304).

γ -КТх в структурном отношении подобны α -КТх, содержат ~35-45 аминокислотных остатков с тремя или четырьмя дисульфидными связями, но главной особенностью этой группы является то, что они селективно действуют на определенный тип K_v каналов – ERG. В настоящее время известно 29 γ -КТх, и все они идентифицированы в яде или транскриптом ядовитых желез скорпионов семейства Buthidae (305, 306).

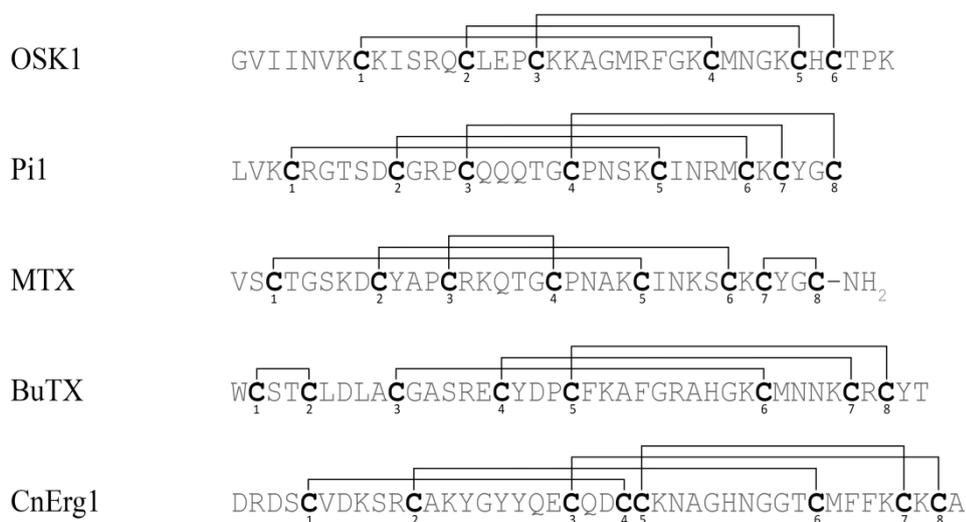


Рисунок 21. Примеры расположения дисульфидных связей у представителей группы КТх с типом укладки $CS\alpha/\beta$.

Как уже было отмечено, число дисульфидных связей у КТх с типом укладки $CS\alpha/\beta$ варьирует от трех до четырех. Интересно, что расположение S-S связей может быть различным (**Рисунок 21**), однако все молекулы этой группы имеют одинаковую укладку (307–311).

- КТх с типом укладки $CS\alpha/a$ и двумя дисульфидными связями

Пептиды этой группы (κ -КТх) являются слабыми ингибиторами K^+ каналов и были найдены только в яде скорпионов семейств *Scorpionidae* и *Hemiscorpiidae*. В структурном отношении κ -КТх состоят из ~20-25 аминокислотных остатков, четыре из которых – остатки цистеина, образующие две внутримолекулярные дисульфидные связи (285). Остатки цистеина формируют консервативные мотивы C^1XXXC^2 и C^3XXXC^4 (где C – остаток цистеина, X – любой аминокислотный остаток), а дисульфидные связи располагаются следующим образом: C^1-C^4 и C^2-C^3 (**Рисунок 22**). Пространственная структура образована двумя параллельными α -спиралями.



Рисунок 22. Расположение дисульфидных связей у κ -КТх на примере κ -хефутоксина.

Для обозначения этой группы пептидов используется префикс κ -, как и для токсинов группы 3 (с типом укладки $CS\alpha/a$ и тремя дисульфидными связями) (312).

- КТх с типом укладки $CS\alpha/a$ и тремя дисульфидными связями

Недавно был обнаружен новый тип укладки у пептидов, расположение остатков цистеина которых считалось традиционным и встречалось у большинства $CS\alpha/\beta$ токсинов. У КТх данной группы, в отличие от токсинов с мотивом $CS\alpha/\beta$, дисульфидные связи располагаются следующим образом: C^1-C^5 , C^2-C^4 и C^3-C^6 (**Рисунок 23**) вместо классического C^1-C^4 , C^2-C^5 и C^3-C^6 , а их пространственная структура представляет собой две α -спирали, соединенные петлей. Пептиды данной группы принято называть κ -КТх, как и КТх с типом укладки $CS\alpha/a$ и двумя дисульфидными связями.



Рисунок 23. Расположение трех дисульфидных связей у пептидов, имеющих характерное для $CS\alpha/\beta$ расположение остатков цистеина, но формирующих фолд $CS\alpha/a$.

В настоящее время известно только два коротких пептида (28-29 аминокислотных остатков) с таким типом укладки, выделенные из яда родственных скорпионов *Tityus serrulatus* и *Tityus trivittatus*, принадлежащих к семейству Buthidae (294).

- КТх с укладкой типа Кунитца

КТх с подобным типом укладки бифункциональны: во-первых, практически все они являются ингибиторами протеолитических ферментов, например, трипсина, и действуют в наномолярных концентрациях; во-вторых, для некоторых отмечено наличие блокирующей активности по отношению к K_v каналам. В настоящее время известно семь молекул из яда скорпионов с подобными свойствами: шесть выделено из яда скорпионов семейства Buthidae и одна – из Caraboctonidae (295). КТх с укладкой типа Кунитца имеют в своем составе ~60-70 аминокислотных остатков, шесть или восемь из которых – остатки цистеина, образующие три или четыре внутримолекулярные дисульфидные связи (**Рисунок 24**) в порядке C^1-C^5 , C^2-C^3 и C^4-C^6 или C^1-C^7 , C^2-C^4 , C^3-C^5 и C^6-C^8 .



Рисунок 24. Расположение дисульфидных связей у блокаторов K^+ каналов с укладкой типа Кунитца.

Этот фолд представлен двумя антипараллельными β -тяжами и одним, реже двумя спиральными участками (313). Токсины этой группы было предложено называть δ -КТх.

- КТх с укладкой типа цистиновый узел

В настоящее время известно около десяти пептидов из яда скорпионов, имеющих укладку типа ИСК, но только для двух из них показана активность на K^+ каналах. В структурном отношении КТх с укладкой ИСК (37 аминокислотных остатков) имеют β -слой, сформированный тремя антипараллельными β -тяжами, и 3_{10} -спираль (314).



Рисунок 25. Расположение дисульфидных связей на примере λ -MeuTx – представителя КТх с фолдом ИСК.

Две дисульфидные связи C^1-C^4 и C^2-C^5 и атомы основной цепи образуют кольцо, через которое проходит третья дисульфидная связь C^3-C^6 (**Рисунок 25**). Помимо того, что

токсины данной группы являются слабыми блокаторами K_v каналов, проведены исследования, показывающие их активность на Ca^{2+} каналах (315).

3.2.2.6.2 Многообразие блокаторов K^+ каналов из яда скорпионов

Как уже отмечалось, в настоящее время известно порядка 250 КТх, выделенных из яда различных скорпионов, и ниже в **Таблице 8** представлено по одному представителю из каждого семейства КТх. Для удобства список выполнен в алфавитном порядке латинского названия вида скорпиона, из которого был выделен тот или иной токсин. Все известные лиганды K^+ каналов, выделенные из яда скорпионов, являются поровыми блокаторами, и они проявляют активность в диапазоне концентраций от нескольких пМ / десятков мкМ. Наиболее активный блокатор $K_v1.3$ канала Vm24 (из скорпиона *Vaejovis mexicanus smithi*) характеризуется константой диссоциации комплекса (K_d) 2,9 пМ (316). Среди токсинов скорпионов найдены молекулы, селективно воздействующие на различные изоформы K_v (например, ВеКм-1 и OSK2) (305, 317) и BK_{Ca} каналов (IbTx) (280). Блокаторы K_{ir} и K_{2p} каналов в яде скорпионов пока обнаружено не было (174).

3.2.2.6.3 Взаимодействие КТх с K^+ каналами

Как уже было отмечено, все лиганды K^+ каналов делятся на поровые блокаторы и модуляторы. Интересным кажется тот факт, что в отличие, например, от пауков, в яде скорпионов до сих пор не было найдено ни одного модулятора K^+ каналов: все активные пептиды в нем – это поровые блокаторы.

Поскольку известные в настоящее время КТх действуют в основном на K_v и в меньшей степени на BK_{Ca} и SK_{Ca} каналы, а самыми активными выступают полипептиды с укладкой $CS\alpha/\beta$, то основные лиганд-рецепторные модели связывания токсинов с каналами рассматривают именно эти молекулы (318–320).

Основываясь на ранних исследованиях α -КТх, было выдвинуто предположение, что поровый участок K^+ канала высококонсервативен и имеет очень сходное строение в разных каналах (321). Позднее это предположение получило серьезные экспериментальные подтверждения: во-первых, были установлены пространственные структуры ряда каналов (46, 322, 323), во-вторых, был получен гибридный канал на основе примитивного бактериального K^+ канала KcsA из *Streptomyces lividans*, который мог быть заблокирован некоторыми α -КТх, в то время как дикий тип был нечувствителен к этим токсинам (324, 325).

Таблица 8. Все известные в настоящее время семейства КТх. В таблице приведено по одной последовательности представителя каждого семейства. Дано название пептида, обозначены семейства: α , β , γ – для токсинов со структурой $CS\alpha/\beta$, κ – для $CS\alpha/\alpha$ токсинов с двумя или тремя дисульфидными связями, δ – для пептидов, имеющих укладку типа Кунитца, λ – для пептидов с фолдом ИСК. Обозначена активность пептидов: * – пептиды, идентифицированные по кДНК, тестирование активности для них не проводилось, 1 – токсины, активные на K_v каналах (кроме K_v11 каналов), 2 – на BK_{Ca} каналах, 3 – на SK_{Ca} каналах, 4 – на IK_{Ca} каналах, 5 – на K_v11 каналах, - – данных по активности нет. Обозначены посттрансляционные модификации: Z – остаток пироглутаминовой кислоты, $-NH_2$ – амидирование. Остатки цистеина выделены полужирным шрифтом, а.о. обозначает количество аминокислотных остатков, Мм – расчетную молекулярную массу.

Токсин	Семейство	ID	Аминокислотная последовательность	а.о.	Мм	Активность
<i>Androctonus australis</i>						
Aa1	$\alpha15.1$	P60233	ZNETNKK C QGGSCASV C RRRIGVAAGK C INGR C V C YP	37	3851	1
AaТХК β	$\beta1$	P69939	KLVKYAVPVGTLRITILQTVVHKVVGKTQFG C FPAYQGY C DDH C QDIKKEEG F CHG F K C K G IPMG F	64	7117	1
<i>Androctonus mauretanicus mauretanicus</i>						
КТХ-1	$\alpha3.1$	P24662	GVEINVK C SGSPQ C LK P CKDAGMRF G K C MNR K CH C TP K -NH ₂	38	4149	1, 2
AmP01	$\alpha8.1$	P56215	V S C ED C PEH C STQ K AQ A K C DND K V CE P I	29	3179	3
<i>Centruroides limpidus limpidus</i>						
CIIErg2	$\gamma4.1$	Q86QU9	DRD S C VDK S K C SKYGY G Q C DE C CKKAGDRAG N CV F K C K C NP	43	4832	*
<i>Centruroides noxius (Mexican scorpion)</i>						
NTx	$\alpha2.1$	P08815	TIIN V K C TSPK Q C SK P CKELYGSSAGAK C MNG K CK C YNN-NH ₂	39	4195	1, 2
CoTx1	$\alpha10.1$	O46028	AV C VY R T C DK D CKRRGYRSG K INN A CK C Y P Y-NH ₂	32	3731	1, 3, 4
CnErg1	$\gamma1.1$	Q86QT3	DRD S C VDK S R C AKYGY Q EC Q DC C KNAGHNGG T CMFF K CK C A	42	4730	5
CnErg2	$\gamma3.1$	P59939	GRD S C VN K SR C AKYGY S Q C EV C CKKAGHKG G T C DF F K C K C V	43	4783	5
<i>Centruroides sculpturatus</i>						
CsErg5	$\gamma5.1$	Q86QU2	DRD S C VDK S R C AKYGY G Q C EV C CKKAGHNGG T CMFF K CM V NS K M N	47	5263	*
<i>Hadrurus gertschi</i>						
Hge- β -КТх	$\beta2$	Q0GY41	KSTVGQ K L K K L NQAVDKVKEVLNKSEY M CPVVS S F C K Q H C AR L G K SG Q CD L LE C I C S	58	6427	1
HgeScplp1	$\beta3$	Q0GY40	GWMSEK V Q G ILDK L PE G IIRNA A K A IV H K M AK N Q F GC F AN V D V K G D C K R H C KA E D K E G I C H G T K CK G V P I S Y L	76	8369	1
Hg1	$\delta1.1$	P0C8W3	GHHNR V N C LL P PK T GP C K G S F ARY F DIET G S C K A F I Y G GC E GN S NN F SE K HH C E K R C R G F R K F GG K	67	7539	1
<i>Heterometrus fulvipes</i>						
κ -HfTx1	$\kappa1.1$	P82850	GH A C Y R N C W REG N DE E T C K E R C -NH ₂	22	2655	1
<i>Heterometrus laoticus</i>						
HeLaTx1	$\kappa5.1$	P0DJ41	S CK K E C SG S RR T KK C M Q K C NRE H GH-NH ₂	25	2917	1
<i>Heterometrus petersii</i>						
HSP040C.1	$\kappa3.1$	P0DJ36	Q W IN A CF N V C M K ISS D K K Y C K Y LC G K N	27	3185	1
HSP040C.2	$\kappa4.1$	P0DJ40	D I PC F ET C M K LY H IP K LY I K R K H	25	3080	1
<i>Leiurus quinquestriatus hebraeus</i>						
ChTX	$\alpha1.1$	P13487	ZFT N V S CT T S K E C WS V Q R L H NT S R G K C M N KK C R C YS	37	4296	1
ScyTx	$\alpha5.1$	P16341	A F C N L R M C Q L S C RS L G L L G K C I G D K CE C V K H-NH ₂	31	3423	3

<i>Lychas mucronatus</i>						
LmKTx2	α 29.1	D9U2A6	EGDCPISEAIK C VEK C KEKVEV C EPGV C KCSG	32	3395	1
LmKTT-1a	δ 2.2	P0DJ46	KKK C QLPSDVGK G KAS F TRY Y NEES G K C ET F IYGGVGGNS N FLTKED C CRE C AQ G SC	59	6495	1
<i>Mesobuthus eupeus</i>						
BeKm-1	γ 2.1	Q9BKB7	RPTDIK C SESY Q CF P V C KSR F GKT N GR C V N GF C DC F	36	4092	5
λ -MeuTx	λ	P86399	G C NRL N KK C NSDAD C CR Y GER C ISTGV N Y C RP D FG P	37	4174	-
<i>Mesobuthus martensii</i>						
BmKK6	α 9.1	Q9NJP7	V G CE E CP M H C K G KN A K P T C DD G V C NC N V	28	2949	1, 3
BmKK1	α 14.1	Q967F9	TP F AI K CATDAD C SR K CP G N P SC R NG F CA C T	31	3233	*
BmKK4	α 17.1	Q95NJ8	Z T Q C Q S VRD C Q Q Y C L T PDR C SY G T C Y C K T T-NH ₂	30	3460	-
BmBKTx1	α 19.1	P83407	AA C Y S SD C RV K CV A MG F SS G K C IN S K C K C Y K	31	3336	2
Kcugx	α 22.1	Q8MUB1	EVD G RT A T F CT Q S I CE E SK R Q N K N GR C V I E A EG S LI Y HL C K C Y	44	4982	*
BmK86	α 26.1	A7KJJ7	N F K V E G A C SK P CR K Y C ID K G A R N G K C I NG R CH C Y Y	35	3981	1
BmKTT-2	δ 3.1	P0DJ50	VD C TL P SD T GR C K A Y F IR Y F Y N Q K A GE C Q K F V Y G GC E GN S N N FLTKSD C CK Q C S PG K C	58	6470	1
<i>Mesobuthus tamulus</i>						
TmTX	α 16.1	P0C173	DLID V K C ISS Q EC W IA C KK V T G R F E G K C Q N R Q C R C Y	36	4207	1
<i>Opisthacanthus madagascariensis</i>						
OmTx1	κ 2.1	P0C1Z3	D P C Y EV C L Q QH G NV K E C EE A CK H P V E	26	2984	1
<i>Pandinus imperator</i>						
Pi1	α 6.1	Q10726	LV K CR G T S DC G R P C Q Q T GC P NS K C I N R M C K C Y G C	35	3835	1, 3
Pi2	α 7.1	P55927	T I SC T NP K Q C Y P H C KK E T G Y P NA K CM N R K C K CF G R	35	4034	1
<i>Parabuthus villosus</i>						
PBTx1	α 11.1	P60164	DE E PK E SC S DE M CV I Y C K G EE Y ST G V C D G P Q K C K C SD	37	4090	1
<i>Tityus obscurus</i>						
To1	α 13.1	P83243	AC G SR K KK C K G SG K C I NG R CK C Y	23	2448	1
To32	α 18.1	P60211	T G P Q T T C Q A A M C E A G C K G L G K S M E SC Q G D T C K C K A	35	3522	1
<i>Tityus serrulatus</i>						
Tityustoxin	α 4.1	P46114	V F IN A K C R G SP E CL P K C KE A IG K A A G K CM N G K C K C Y P	37	3942	1, 2
BuTX	α 12.1	P59936	W C ST C LD L AC G AS R E C Y D PC F KA F GRA H G K CM N N K C R C Y T	40	4506	1
Ts15	α 21.1	P86270	G K F G K C K P NI C AK T C Q TE K G K MG Y C N K T EC V C S EW	36	3956	1
<i>Tityus trivittatus</i>						
Tt28	α 20.1	P0C183	G C T P E Y CS M W C K V K V S Q NY C V K N C K C P G R	29	3310	1
κ -BUTX-Tt2b	κ	B3A0L5	G C M P E Y C A GC R G K V S Q D Y C L K N C R C IR	28	3180	1
<i>Vaejovis mexicanus smithi</i>						
Vm24	α 23.1	P0DJ31	AAA I SC V GS P EC P PK C RA Q G C K N G K CM N R K C K Y Y C-NH ₂	36	3864	1, 3

Для некоторых токсинов было показано, что они взаимодействуют с селективным фильтром поровой области K_v или $ВК_{Ca}$ каналов с помощью аминокислотных остатков, располагающихся в β -шпильке (326–328). В то же время, другие блокаторы взаимодействуют с нижней частью вестибуля SK_{Ca} каналов посредством аминокислотных остатков, располагающихся не в β -шпильке, а в α -спирали (329–331). И третий вариант наблюдается при взаимодействии специфических γ -КТх с EAG каналами, при котором лиганд располагается далеко от селективного фильтра канала, вследствие удлиненных внеклеточных петель последнего (332, 333).

Факт существования огромного разнообразия пептидов с различной структурой, действующих на K^+ каналы, позволил предположить наличие ключевых молекулярных детерминант, которые и отвечают за взаимодействие лиганда с рецептором. Ряд работ показал, что мутации определенных аминокислотных остатков как в канале, так и в токсине могут приводить к существенному изменению аффинности и селективности КТх.

У множества КТх была обнаружена так называемая «функциональная диада» (334), которая принимает участие в лиганд-рецепторном взаимодействии и обеспечивает блок проведения ионов K^+ . Диада состоит из двух высококонсервативных аминокислотных остатков, один из которых – лизин, а другой может быть тирозином, фенилаланином (330, 334) или лейцином (335). Согласно модели функциональной диады, остаток лизина заходит в пору канала своей боковой цепью, где оказывается окруженным кольцом карбонильных групп одинаковых отрицательно заряженных аминокислотных остатков – аспарагиновой или глутаминовой кислоты. Каждый остаток аспарагиновой или глутаминовой кислоты принадлежит одной из четырех α -субъединиц тетрамерного K^+ канала. При замене этого лизина на другой аминокислотный остаток наблюдается значительное падение аффинности токсина (336, 337). Ароматический или алифатический аминокислотный остаток диады предположительно формирует контакты с остатком тирозина или триптофана, принадлежащим какой-либо одной α -субъединице канала (338–340).

Стоит отметить, что данная модель не является исчерпывающей, и для некоторых токсинов, лишенных функциональной диады, было показано высокоаффинное взаимодействие с некоторыми изоформами K^+ каналов (341). Кроме того, была описана модель функциональной триады, согласно которой, помимо важного для связывания с порой остатка лизина, еще необходимы два гидрофобных остатка (342).

Основываясь на результатах молекулярного докинга, была предложена альтернативная модель «кольца основных аминокислот», которое, как оказалось, присутствует у множества блокаторов K_v каналов. Действительно, было показано, что

основные аминокислотные остатки кольца способны образовывать солевые мостики с отрицательно заряженными аминокислотными остатками α -субъединицы канала. Для некоторых токсинов было найдено четыре остатка лизина или аргинина, отвечающие за подобные взаимодействия, но у ряда других молекул число таких остатков может варьировать (338, 339).

Поскольку наблюдаются различия в селективности различных КТх к множеству изоформ K^+ каналов, модели функциональной диады и кольца основных аминокислот не подходят для описания уникальных взаимодействий токсин-канал. В литературе всё больше появляется данных, свидетельствующих о том, что не только остатки диады или кольца принимают участие во взаимодействии токсинов с каналами. Так, например, для остатка аспарагина (Asn30) у AgTx2 была показана важная роль в стабилизации комплекса (284). В результате была предложена третья модель, которая говорит о необходимости создания функциональных карт «комплементарных» поверхностей токсинов и каналов, находящихся в непосредственном контакте. Каждому аминокислотному остатку присваивается свой «коэффициент важности», и очевидно, что такой коэффициент будет значительным для аминокислот диады (343).

В настоящее время разрешена пространственная структура комплекса ChTx и химеры $K_v1.2$ - $K_v2.1$, и показано, что токсин взаимодействует с каналом без значительного изменения структуры селективного фильтра (**Рисунок 26**). Как и предполагалось, важную роль играет остаток лизина (Lys27) из функциональной диады. Lys27 окружен карбонильными группами остатков тирозина каждой из четырех α -субъединиц канала.

α -Спиральный участок молекулы токсина ориентирован наружу, а участок β -шпильки обращен в сторону поры канала. Tyr36 из функциональной диады взаимодействует с Asp375 и Val377 одной из α -субъединиц, а Met29 при этом контактирует с Asp375 соседней α -субъединицы. Ближе к периферии боковая цепь Arg25 токсина находится в непосредственной близости от Gln353 канала, при этом главная цепь токсина в области Thr8-Thr9 расположена вблизи Gln353 другой субъединицы канала. Для некоторых аминокислотных остатков, похоже, реализуются электростатические взаимодействия. Так, например, Arg34 и Arg25 токсина вовлечены в электростатические взаимодействия с Asp375 и Asp359 канала, соответственно. Asn30, по-видимому, формирует водородную связь с Asp375 (336).

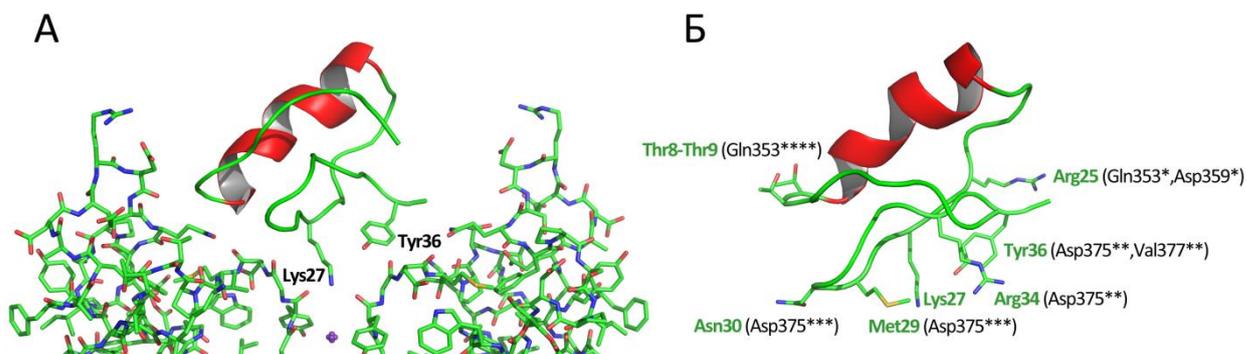


Рисунок 26. А – пространственная структура комплекса химеры $K_v1.2$ - $K_v2.1$ с ChTx (PDB ID: 4JTA). Показан ключевой остаток лизина (Lys27), а также ароматический остаток диады (Tyr36). Видно, что Lys27 заходит в пору канала боковой цепью. Б – аминокислотные остатки ChTx, вовлеченные во взаимодействия с аминокислотными остатками канала (в скобках). Звездочки обозначают принадлежность конкретного аминокислотного остатка одной из четырех α -субъединиц.

Структура комплекса ChTx и $K_v1,2$ - $K_v2.1$, с одной стороны, подтвердила модели, предложенные ранее, и объяснила вовлеченность во взаимодействие токсина с каналом некоторых важных аминокислотных остатков, таких как Lys27. Но с другой стороны, некоторые аспекты нуждаются в пересмотре и в дополнительном изучении. Например, Tyr36, кажется, вносит большой вклад в образование комплекса своей гидроксильной группой и за счет большого размера, а не гидрофобностью, как считалось ранее. Дальнейшие исследования, очевидно, будут направлены на получение кристаллических структур комплексов различных токсинов с каналами из разных семейств (K_v , $ВК_{Ca}$ и SK_{Ca}) с целью разобраться в молекулярных основах специфичности подобных взаимодействий.

3.3 Практическое применение полипептидных лигандов K^+ каналов

Как уже отмечалось выше, важная роль в изучении K^+ каналов принадлежит полипептидным лигандам из природных источников. Токсины использовались в ранних работах для выделения каналов (277), а позднее их радиоактивно-меченые и флуоресцентные аналоги послужили инструментами исследования фармакологических свойств и локализации K^+ каналов (344, 345).

K^+ каналы были хорошо изучены с точки зрения участия в клеточной возбудимости, а их роль в процессах клеточной миграции, пролиферации и ангиогенеза была показана сравнительно недавно (346). Большое функциональное разнообразие и широкое распространение K^+ каналов делают это суперсемейство мембранных белков интересной фармакологической мишенью для разработки лекарств, в том числе полипептидной природы (347).

3.3.1 Применение радио- и флуоресцентно-меченых аналогов токсинов

Токсины, меченные радиоактивным изотопом йода (^{125}I) по остаткам Tyr/His (348, 349), а также тритием (3H) (350), использовались для изучения распределения K^+ каналов, характеристики их фармакологического профиля, а также для выделения каналов из образцов тканей и подтверждения их субъединичного состава (344, 351–353). Однако существует ряд существенных ограничений в применении радиоактивно-меченых токсинов, а именно: сложность утилизации радиоактивных отходов, необходимость соблюдения особых условий работы и высокая стоимость подобных проектов (354).

В последнее время широкое распространение получило использование флуоресцентных меток (**Рисунок 27**). В большинстве случаев органическая метка ковалентно присоединяется к аминогруппе лизина (355) или тиольной группе остатка цистеина, дополнительно введенного в структуру токсина (356), кроме того, могут использоваться биотинилированные производные токсинов в паре с флуоресцентно-меченым стрептавидином (357). Для получения флуоресцентно-меченых аналогов токсинов обычно применяются такие метки, как Cy3, Cy5, Alexa488, Alexa546 и TAMRA (354).

Для некоторых флуоресцентных производных токсинов удалось продемонстрировать лиганд-рецепторное взаимодействие с K^+ каналами на мономолекулярном уровне (202), а также применить их в проточной цитометрии для детекции определенного репертуара клеток, экспрессирующих конкретные изоформы K_v каналов (201).

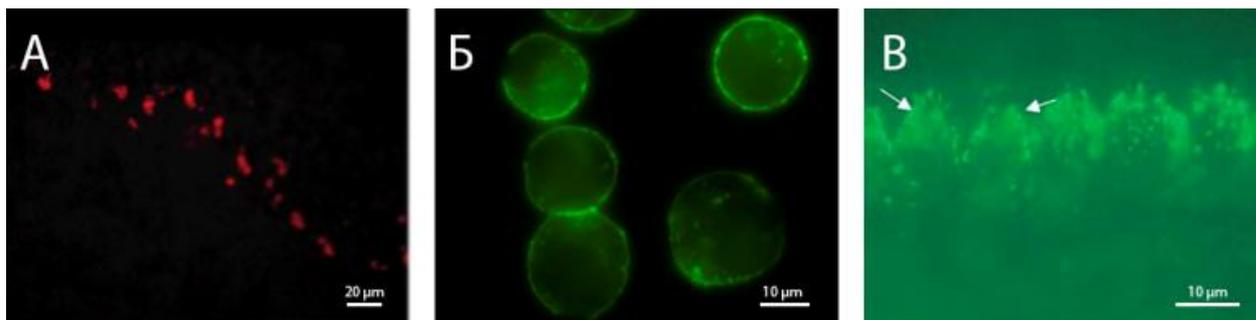


Рисунок 27. Визуализация K^+ каналов с помощью токсинов и их флуоресцентно-меченых аналогов. А – Визуализация K_v каналов на срезах мозжечка крысы с помощью HgTX1-A19C-Alexa546 (356). Б – Флуоресцентное изображение клеток HEK293 (стабильно экспрессирующих BK_{Ca} каналы), обработанных биотинилированным IbTx, а затем стрептавидином с меткой Alexa488 (357). В – Локализация BK_{Ca} каналов на внутренних волосковых клетках Кортиева органа с помощью IbTx-Alexa488 (358). Изображения взяты из оригинальных работ с разрешения издательств Springer (А, Б) и Elsevier (В).

3.3.2 K^+ каналы как мишень при различных патологиях

Ионные каналы, уступая лишь G-белок-сопряженным рецепторам и киназам, являются третьей по величине группой белков человека, участвующих в передаче сигналов (172). В настоящее время порядка 13% лекарственных препаратов, представленных на рынке, воздействуют на ионные каналы (359), что позволяет этим мембранным белкам занять второе место в списке наиболее распространенных фармакологических мишеней после G-белок-сопряженных рецепторов (360). K^+ каналы (78 генов у человека) являются самым представленным суперсемейством среди ионных каналов, поэтому неудивительно, что они вовлечены в патогенез различных заболеваний и выступают в качестве перспективных фармакологических мишеней (361).

Изучена роль K^+ каналов в некоторых аутоиммунных заболеваниях, таких как рассеянный склероз, ревматоидный артрит, псориаз и диабет I типа (362–364). Одними из основных участников развития этих заболеваний выступают эффекторныe T-лимфоциты. Активация и пролиферация T-лимфоцитов, а также выработка ими интерлейкинов требуют высокой концентрации Ca^{2+} в цитоплазме, которая достигается за счет работы ряда Ca^{2+} каналов (365). Поддержание низкого мембранного потенциала при этом реализуется за счет выходящего тока ионов K^+ через $K_v1.3$ и IK_{Ca} каналы, которые присутствуют в этих клетках в виде гомотетрамеров (366–368). При развитии аутоиммунного заболевания T-лимфоциты приобретают характерный профиль, характеризующийся, помимо прочего, гиперэкспрессией $K_v1.3$ (362). Ингибирование K^+ каналов препятствует выходу ионов K^+ из клетки, что делает невозможным вход Ca^{2+} в цитоплазму, в результате чего останавливается пролиферация и выработка интерлейкинов эффекторными T-лимфоцитами (369). Функциональная активность этих клеток

поддерживается в основном $K_v1.3$, поэтому блокирование именно этой изоформы K^+ каналов рассматривается эффективным вариантом терапии аутоиммунных заболеваний. При этом мембранный потенциал других лимфоцитов поддерживается в основном за счет IK_{Ca} каналов, что позволяет им нормально функционировать (370).

Уже давно было замечено, что укус скорпиона приводит к остановке развития рассеянного склероза (371), а позднее, вместе с установлением молекулярных основ развития заболевания, блокаторы K^+ каналов из яда различных животных были предложены на роль лекарственных препаратов (347). Наибольшего прогресса достигла разработка селективного блокатора $K_v1.3$ на основе токсина ShK, выделенного из яда морской анемоны *Stichodactyla helianthus* (**Рисунок 15**) (214, 372). Был получен ряд улучшенных производных этого соединения (373), а одно из них – ShK-186 – прошло 1 фазу клинических исследований (374). Такие токсины скорпионов, как MgTx, OSK1 и ChTx и их модифицированные производные также показали высокий потенциал в модельных экспериментах по лечению аутоиммунных заболеваний (375–377).

Недавно была показана вовлеченность $K_v1.3$ в патогенез астмы (378), а воздействие ShK-186 на этот канал позволяет проводить эффективную терапию заболевания в модельных экспериментах (379). Также комбинированное ингибирование $K_v1.3$ и IK_{Ca} каналов – возможный способ предотвращения отторжения тканей при трансплантации органов (380).

Порядка десяти типов K^+ каналов вовлечены в заболевания сердечно-сосудистой системы. Основными участниками некоторых видов аритмии, таких как фибрилляция предсердий, синдром Андерсена, а также синдромы удлинённого и укорочённого интервала QT, выступают каналы $K_{ir}2.1$, $K_{ir}3.4$, $K_{2p}17.1$, $K_v1.5$, $K_v4.3$, $K_v7.1$ и $K_v11.1$ (381). В большинстве случаев неправильная работа того или иного канала (каналопатия) вызвана определенными мутациями их генов (382). В этом случае вещества, селективно воздействующие на эти типы K^+ каналов (например, BeKm-1), обладают высоким терапевтическим потенциалом (305).

Как уже отмечалось, K^+ каналы – основные участники формирования потенциала действия и передачи нервного сигнала (см. Введение). Нарушение работы этих мембранных белков ассоциировано с многочисленными нейрофизиологическими отклонениями, такими как судороги, эпилепсия и аутизм (383–385). Как и в случае с аритмией, неправильная работа каналов может быть следствием мутаций. Ключевыми игроками в этой области выступают нейрональные K^+ каналы: $K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v4.2$, $K_v7.2$, $K_v7.3$, а для терапии нейрофизиологических расстройств, главным образом, используются низкомолекулярные лиганды (172, 174).

Аномальная экспрессия K^+ каналов описана для многих видов опухолевых клеток (386). Некоторые изоформы ($K_{ir}1.1$, $K_{ir}3.4$, $K_{2p}5.1$, $K_{2p}9.1$, $K_v1.1$, $K_v1.3$, $K_v1.5$, $K_v10.1$, $K_v10.2$, $K_v11.1$, $K_{Ca}1.1$, $K_{Ca}2.3$, $K_{Ca}3.1$) тем или иным образом вовлечены в патогенез рака и в дальнейшем могут рассматриваться как мишени в терапии онкозаболеваний (346). Более широкий спектр K^+ каналов участвует в процессах, ассоциированных с хронической болью (387), и кандидатами в анальгетики являются активаторы K^+ каналов (388).

3.4 Заключение

K^+ каналы – суперсемейство интегральных мембранных белков, отвечающих за пассивный транспорт ионов K^+ через клеточную мембрану. Работа K^+ каналов, как и большинства других ионных каналов, может быть модифицирована воздействием различных лигандов. Лиганды, связывающиеся с K^+ каналами, можно разделить на несколько групп, основными из которых являются: ионы металлов, небольшие органические молекулы и полипептидные токсины. Кроме того, на многие изоформы K^+ каналов были получены антитела. По механизму действия все лиганды K^+ каналов можно разделить на поровые блокаторы и модуляторы.

В настоящее время известно порядка 400 полипептидных лигандов, выделенных из ядовитых животных. Из них около 250 – токсины из яда скорпионов (КТх), которые объединяются в шесть семейств согласно структурно-функциональным особенностям, но все они являются поровыми блокаторами K^+ каналов. Такие КТх, как ChTx, ВеКм-1 и OSK1, наравне с апамином из яда медоносной пчелы, стали классическими инструментами исследования K^+ каналов. В последнее время K^+ каналы стали рассматривать в качестве перспективных фармакологических мишеней в некоторых аутоиммунных, респираторных и нейродегенеративных заболеваниях. В свою очередь лиганды каналов выступают в качестве потенциальных лекарственных средств для терапии этих заболеваний.

Ежегодно база данных UniProt пополняется новыми полипептидными токсинами, активными на K^+ каналах, что свидетельствует о высоком интересе к этой научной области. Очевидно, что дальнейшее изучение подобных молекул необходимо сосредоточить не только на выделении новых полипептидов, но и на их детальной физиологической и структурной характеристике.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

5.1 Материалы

5.1.1 Реактивы

Агароза (Хеликон, Россия), 4',6-амидино-2-фенилиндол дигидрохлорид (DAPI), 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диол (Трис), бычий сывороточный альбумин (БСА), бромфеноловый синий, гидрокарбонат аммония, гидрокарбонат натрия, гидроксид натрия, 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES), гидрофосфат натрия, D-глюкоза, гуанидин гидрохлорид, дигидрофосфат калия, дигидрофосфат натрия, додецилсульфат натрия (ДСН), желатин из кожи быка, интерлейкин-2, ксиленцианол, 2-меркаптоэтанол, параформальдегид, пироглутаматаминопептидаза (ЕС: 3.4.19.3), сахароза, сульфат магния, тетраэтиламмоний (ТЭА), тритон X-100, фосфат натрия, хлорид калия, хлорид кальция, хлорид магния, хлорид натрия, эндопротеиназа Glu-C (ЕС: 3.4.21.19), 2-(*N*-морфолино)-этансульфоновая кислота (MES), этилендиаминтетраацетат натрия (ЭДТА) (Sigma-Aldrich, США), амфотерицин В (Ф-Синтез, Россия), антитела к CD8 мыши с флуоресцентной меткой PerCP-Cy5.5 (Santa Cruz Biotechnology, США), аскорбиновая кислота, бикарбонат аммония, имидазол, Кумасси G-250 (Merck, Германия), ацетат натрия, глицерин, изопропанол, метанол, уксусная кислота, хлороводородная кислота, этанол (Химмед, Россия), ацетонитрил, изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) (Panreac, Испания), бакто-триптон, дрожжевой экстракт (Becton Dickinson, Франция), 4-винилпиридин, 2,5-дигидроксибензойная кислота, 1,4-дитиотреитол (ДТТ), трифторуксусная кислота (ТФУ), α -циано-4-гидроксикоричная кислота (Fluka, Франция), гентамицин (KRKA, Словения), ДНК-лигаза фага T4, наборы реактивов GeneJET Purification Kit, GeneJET Gel Extraction Kit, GeneJET Plasmid Miniprep Kit, стандарты для агарозного электрофореза GeneRuler 100 bp и 1 kb, эндонуклеазы рестрикции *EcoRI*, *NdeI*, *NotI*, *SalI* и *SphI* (Thermo Scientific, США), иономицин (Serva, Германия), канамицин (Красфарма, Россия), липофектамин, форбол-12-миристан-13-ацетат (PMA) (Invitrogen, США), набор реактивов для выделения мРНК (Amersham Pharmacia Biotech, Великобритания), набор реактивов для получения кДНК (Stratagene, США), олигонуклеотидные праймеры, смесь четырех дезоксинуклеотидов (dNTPs), Taq-полимераза (Евроген, Россия), плазмидные векторы pBS SK, pET-28a (Novagen, США) и pSP64T (BELGIAN COORDINATED COLLECTIONS OF MICROORGANISMS, Бельгия), плазмидный вектор pсDNA 3.1 с геном K_v1.3 человека (hK_v1.3) (GenScript, США), раствор для выделения на основе фиколла Ficoll Paque Plus (GE Healthcare, Великобритания), рекомбинантные токсины AgTx2 и OSK1, а также AgTx2, меченный 5-

карбокситетраметил-родамином (R-AgTx2) (предоставлен к.х.н. Ю.В. Корольковой), система для транскрипции mMESSAGE mMACHINE T7 (Ambion, США), тризол, Dynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28 (Life Technologies, США), хлороформ (Криохром, Россия), эмбриональная телячья сыворотка (FBS, PAA Laboratories GE, Австрия).

5.1.2 Растворы

Все растворы были приготовлены с использованием деионизованной воды (сопротивление 18,2 МОм).

- Растворы для эксклюзионной и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии:
 - A₁ – 0,1% (v/v) ТФУ в воде
 - A₂ – 10 мМ Трис-НСl (рН 8,0)
 - B₁ – 0,1% (v/v) ТФУ в 10% (v/v) ацетонитриле
 - B₂ – 0,1% (v/v) ТФУ в ацетонитриле
 - B₃ – 0,1% (v/v) ТФУ, 50% (v/v) ацетонитрил, 20% (v/v) изопропанол
 - B₄ – 50% (v/v) ацетонитрил, 10 мМ Трис-НСl (рН 8,0)
- Растворы матриц для масс-спектрометрии:
 - C₁ – 10 мг/мл 2,5-дигидроксibenзойная кислота, 70% (v/v) ацетонитрил, 0,1% (v/v) ТФУ
 - C₂ – 10 мг/мл α-циано-4-гидроксикоричная кислота, 70% (v/v) ацетонитрил, 0,1% (v/v) ТФУ
- Раствор для восстановления-алкилирования:
 - D₁ – 6 М гуанидин гидрохлорид, 3 мМ ЭДТА, 0,5 М Трис-НСl (рН 8,5)
- Растворы для селективного протеолиза:
 - E₁ – 50 мМ фосфатный буфер (28,85 мМ Na₂HPO₄ и 21,15 мМ NaH₂PO₄, рН 7,0), 10 мМ ДТТ, 1 мМ ЭДТА
 - E₂ – 50 мМ аммоний-бикарбонатный буфер (NH₄HCO₃, рН 8,0)
- Растворы для физиологического тестирования:
 - F₁ (PBS) – 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 1,76 мМ KH₂PO₄ (рН 7,4)
 - F₂ – 10 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 250 мМ сахараза, 0,3 мМ ЭДТА, 4 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 0,1% (w/v) БСА
 - F₃ (ND96) – 96 мМ NaCl, 2 мМ KCl, 1,8 мМ CaCl₂, 2 мМ MgCl₂, 5 мМ HEPES (рН 7,4)

F₄ (Кребса-Рингера) – 120 мМ NaCl, 4,8 мМ KCl, 2,0 мМ CaCl₂, 1,2 мМ MgSO₄, 25 мМ NaHCO₃, 10,1 мМ D-глюкоза, 20 мМ HEPES (pH 7,4), 0,13 мМ аскорбиновая кислота

- Раствор для ПЦР:
G₁ – 50 мМ Трис-НСl (pH 8,6), 0,05 М KCl, 1,5 мМ MgCl₂, 0,1% (v/v) Твин
- Растворы для рестрикции:
H₁ – 50 мМ Трис-НСl (pH 7,5), 10 мМ MgCl₂, 100 мМ NaCl, 0,1 мг/мл БСА
- Раствор для проведения электрофоретического разделения нуклеиновых кислот:
I₁ – 0,25% (w/v) бромфеноловый синий, 0,25% (w/v) ксиленцианол и 30% (v/v) глицерин
I₂ – 40 мМ Трис-ацетат (pH 7,6), 1 мМ ЭДТА и 0,5 мкг/мл бромид этидия
- Раствор для лигирования:
J₁ – 0,4 М Трис-НСl (pH 7,8), 100 мМ MgCl₂, 100 мМ ДТТ, 5 мМ АТФ
- Растворы для аффинной хроматографии:
K₁ – 50 мМ Трис-НСl (pH 8,0), 300 мМ NaCl
K₂ – 50 мМ Трис-НСl (pH 8,0), 500 мМ NaCl, 5% (v/v) глицерин, 1% (v/v) Тритон X-100, 5 мМ имидазол
K₃ – 50 мМ Трис-НСl (pH 8,0), 300 мМ NaCl, 150 мМ имидазол
- Растворы для проведения электрофоретического разделения белков:
L₁ – 25 мМ Трис-НСl (pH 8,3), 250 мМ глицин, 0,1% (w/v) додецилсульфат натрия
L₂ – 20% (w/v) додецилсульфат натрия, 50% (v/v) глицерин, 4% (v/v) 2-меркаптоэтанол, 0,5 М ЭДТА, 0,5 М Трис-НСl (pH 6,8), 0,1% (w/v) бромфеноловый синий
L₃ – 0,25% (w/v) Кумасси R-250, 10% (v/v) уксусная кислота, 30% (v/v) изопропанол
L₄ – 7% (v/v) уксусная кислота, 10% (v/v) этанол
- Питательные среды для культивирования клеток:
LB – 1% (w/v) бакто-триптон, 0,5% (w/v) дрожжевой экстракт, 1% (w/v) NaCl, 10 мМ Трис-НСl (pH 7,6)
DMEM (ПанЭко, Россия) – питательная среда с содержанием 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 50 мкг/мл гентамицина и 2,5 мкг/мл амфотерицина В для культивирования эукариотических клеток НЕК293Т
RPMI (Gibco RPMI 1640, Thermo Scientific, США) – питательная среда для культивирования лимфоцитов

5.1.3 Биологический материал

Цельные яды шести видов скорпионов (*Androctonus amoreuxi*, *Buthacus arenicola*, *Euscorpis mingrelicus*, *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, *Mesobuthus eupeus* и *Orthochirus scrobiculosus*) и 21 вида пауков (*Agelena orientalis*, *Agelenopsis potteri*, *Araneus grossus*, *Araneus marmoreus*, *Eresus niger*, *Heriades* sp., *Latrodectus pallidus*, *Latrodectus tadjicus*, *Linothele* sp., *Micrommata virescens*, *Paracoelotus birulai*, *Pisaura mirabilis*, *Poecilotheria fasciata*, *Pterinochilus murinus*, *Segestria* sp., *Steatoda* sp., *Tegenaria agrestis*, *Tegenaria* sp., *Thanatus* sp., *Thomisus onustus*, *Tibelus oblongus*) были взяты из коллекции отдела молекулярной нейробиологии ИБХ РАН.

5.1.4 Культуры клеток

Бактериальные штаммы для молекулярного клонирования *Escherichia coli* XL1-Blue, а также для проведения экспрессии *E. coli* BL21(DE3) (Novagen, Германия). Культура клеток для проведения трансфекции HEK293T (GE Healthcare, Великобритания).

5.1.5 Лабораторные животные

Аутбредные крысы линии Wistar и мыши линии ICR (CD-1) (питомник лабораторных животных «Пушино», Россия).

5.1.6 Оборудование

Автоматические пипетки на 10, 200, 1000 мкл (Gilson, Франция), автоматический секвенатор PPSQ-33A, спектрофотометр UV-1800 (Shimadzu, Япония), вакуумный концентратор CentriVar, прибор для лиофильной сушки FreeZone 2.5 (Labconco, США), вибратор серии 1000 (Intracel, Великобритания), встряхиватель пробирок MS1 (Ika Works, США), градиентный хроматограф 1525, детектор 2489 (Waters, США), ДНК секвенатор 373 (Applied Biosystems, США), источник питания EPC 500, хроматограф P-3500 (Pharmacia Fine Chemicals, США), камеры для агарозного (Wide Mini-Sub Cell GT) и полиакриламидного электрофореза (Mini-PROTEAN Tetra Cell) (Bio-Rad, США), конфокальный лазерный сканирующий микроскоп LSM 710 (Zeiss, Германия), твердофазный нагреватель Thermomixer compact, центрифуга 5417R, центрифуга Eppendorf 5804R, электропоратор 2510 (Eppendorf, Германия), лабораторный pH-метр pH-420 (Аквилон, Россия), ламинар BSB 4A (Gelaire, Италия), масс-спектрометр Ultraflex TOF-TOF (Bruker Daltonics GmbH, США), мириноинжектор Nanoject II (Drummond Scientific, США), микрошприц для нанесения 500 мкл (Hamilton, США), настольные весы (Sartorius, США), CO₂-инкубатор MCO-15AC, низкотемпературный холодильник MDF-U32V

(SANYO Electronic Biomedical, Япония), проточный флуориметр Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, США), ПЦР-амплификатор PTC-200 (MJ Research, США), стерилизатор паровой автоматический ВКа-75-ПЗ (Касимовский ПЗ, Россия), термостат (LAB-LINE Instruments, США), ультразвуковая система 8892E-МТН, ультразвуковой дезинтегратор CPX 750 (Cole-Parmer Instruments, США), установка для очистки и деионизации воды Simplicity UV (Merck Millipore, Германия), флуоресцентный микроскоп IX71 (Olympus, Япония), шейкер innova 2000 (New Brunswick Scientific, США), шпатели Дригальского (Биолаб, Россия), электрофизиологическая установка Geneclamp 500 (Molecular Devices, США).

5.1.7 Расходные материалы

Колбы стеклянные (Симас, Россия), колонка для аффинной хроматографии со смолой TALON Superflow Metal Affinity Resin (Clontech, США), колонки для очистки ДНК (Life Technologies, США), кюветы для электропорации объемом 100 мкл, наконечники для пипеток (QSP, США), парафиновая пленка Parafilm M (Bemis, США), плашки 6- и 12-луночные пластиковые (Sigma-Aldrich), полиакриламидные гели для электрофоретического разделения белков Mini-PROTEAN TGX (Bio-Rad), пробирки объемом 0,4, 1,7, 4, 15 и 50 мл (Eppendorf), силиконовые камеры flexiPERM (Perbio, Бельгия), хроматографические колонки TSK 2000SW (7,5 × 600 мм, размер пор 12,5 нм, диаметр частиц 10 мкм; Тоyo Soda Manufacturing, Япония), Jupiter C₅ (4,6 × 250 мм, размер пор 30 нм, диаметр частиц 5 мкм, Phenomenex, США), Vydac 218TP54 C₁₈ (4,6 × 250 мм, размер пор 30 нм, диаметр частиц 5 мкм; Separations Group, США), флаконы для культивирования эукариотических клеток объемом 25 см² (Corning, США), чашки Петри пластиковые (Литопласт-Мед, Россия).

5.1.8 Программное обеспечение

Программное обеспечение для обработки результатов масс-спектрометрии Data Analysis 4.3 и Data Analysis Viewer 4.3 (Bruker Daltonics), программные оболочки для работы с хроматографами: МультиХром (Амперсенд, Россия) и Breeze 2 (Waters), программа для обработки флуоресцентных изображений ImageJ (National Institute of Health, США), программа для трансляции нуклеотидных последовательностей (<http://bioinformatics.org/sms2/translate>), программы поиска сходных последовательностей в электронных базах данных BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), программа для работы с нуклеотидными последовательностями Notepad++ v5.9 (Notepad++ team), программа для сравнения аминокислотных последовательностей Clustal Omega

(<http://ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), программа для поиска сигнальных пептидов SignalP 4.1 (<http://cbs.dtu.dk/services/SignalP>), база данных полипептидных последовательностей UniProt (<http://uniprot.org/>), программа для построения филогенетических деревьев пакета программ MEGA6 (<http://megasoftware.net/>), программа для работы с аминокислотными последовательностями ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>), пакет программ Lasergene для работы с нуклеотидными и аминокислотными последовательностями (DNASTAR, США), молекулярно-графическая система PyMOL 1.7.4 (Schrödinger, США), оболочка UCSF Chimera 1.10.1 для программы Modeller 9.14 (Andrej Sali, США), программы для работы с растровыми и векторными изображениями Adobe Photoshop CC, Adobe Illustrator CC (Adobe Systems, США) и Corel Draw X6 (Corel, США), программное обеспечение для проточного флуориметра Kaluza 1.3 (Beckman Coulter), программа обработки статистических данных Origin (Microcal, США).

5.2 Методы

5.2.1 Разработка программного обеспечения

Разработка программного обеспечения и создание базы данных Kalium были выполнены в сотрудничестве с лабораторией моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН. Kalium – веб-приложение, основанное на принципе «Модель-Вид-Контроллер» и созданное с применением технологий OpenUI 5 (клиентский интерфейс), Django (серверный движок) и SQLite 3 (база данных). Работа веб-интерфейса основана на технологии асинхронных запросов через Java Script/XML (AJAX) и динамически генерируемых HTML5 веб-страницах. Панель управления базой данных была сделана на основе стандартного интерфейса администратора в Django. Главный элемент интерфейса Kalium – таблица с информацией о токсинах – имеет начальный параметр сортировки по именам. Таблица поддерживает поиск, множественный выбор элементов, сортировку и фильтрацию параметров, а также сравнение последовательностей с использованием сервера Clustal Omega.

Таблицы молекулярных масс всех аминокислотных остатков и их модификаций были взяты с сервера ExPASy:

- 1) http://web.expasy.org/findmod/findmod_masses.html#aas – молекулярные массы аминокислотных остатков;
- 2) <http://web.expasy.org/findmod/AMID.html> – амидирование C-концевых аминокислотных остатков;
- 3) <http://web.expasy.org/findmod/PYRRE.html> – преобразование N-концевого остатка глутамина в пироглутаминовую кислоту;

- 4) для учета дисульфидных связей из молекулярной массы цистеина вычиталась молекулярная масса одного протона.

5.2.2 Конструирование и анализ библиотеки кДНК

Конструирование библиотеки кДНК было выполнено в сотрудничестве с компанией DuPont Agriculture and Nutrition (США). Ядовитые железы скорпионов *Mesobuthus eupeus* и *Orthochirus scrobiculosus* были выделены, гомогенизированы и лизированы с помощью Тризола. ПолиА(+) РНК была получена с помощью набора для выделения мРНК. Синтез одноцепочечных и двуцепочечных кДНК, добавление линкеров и клонирование в рBS SK(+) вектор были выполнены согласно протоколу набора для получения кДНК. Полученные кДНК были очищены с помощью специальных колонок. Секвенирование было выполнено с праймера M13 с использованием набора ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready и AmpliTaq ДНК полимеразы (Perkin Elmer) на ДНК секвенаторе Applied Biosystems 373.

Полученные нуклеотидные последовательности были транслированы *in silico*. Программа Notepad++ v5.9 была использована для поиска аминокислотных последовательностей с определенным расположением остатков цистеина. Мотивы аминокислотных последовательностей были представлены с помощью регулярных выражений – последовательностей символов и метасимволов, которые формируют поисковый шаблон. Поиск был осуществлен по следующим регулярным выражениям:

$Mx_{\infty}Cx_3Cx_{\infty}Cy_1Cx_{\infty}^*$ для мотива цистеин-стабилизированные α -спираль и β -слой ($CS\alpha/\beta$);

$Mx_{\infty}Cx_6Cx_5CCx_{\infty}^*$ для мотива «цистиновый узел» (ICK);

$Mx_{\infty}Cx_{24}Cx_{20}Cx_3Cx_{\infty}^*$ для мотива типа Кунитца;

$Mx_{\infty}Cy_3Cy_{\infty}Cy_3Cy_{\infty}^*$ для мотива, имеющего в своей структуре две параллельные α -спирали, соединенные двумя дисульфидными связями ($CS\alpha/\alpha\ 2(C-C)$),

где М – остаток метионина, С – остаток цистеина, х – любой аминокислотный остаток, у – любой аминокислотный остаток, кроме цистеина. * обозначает стоп трансляции.

Подстрочные символы показывают конкретное количество аминокислотных остатков, а ∞ обозначает любое количество аминокислотных остатков.

Найденные аминокислотные последовательности были сгруппированы по гомологии с использованием Clustal Omega. BLAST был использован для поиска и сравнения полученных аминокислотных последовательностей с известными ранее. Программа SignalP 4.1 была использована как для идентификации предполагаемых N-концевых сигнальных пептидов, так и для идентификации бессмысленных и неполных аминокислотных последовательностей без сигнальных пептидов. Филогенетические

деревья были построены с помощью пакета программ MEGA6 (389) с использованием метода «ближайшего соседа» (390).

5.2.3 Эксклюзионная хроматография

Образцы цельного яда скорпионов *M. eupeus* и *O. scrobiculosus*, высушенные лиофильно, растворяли в 300 мкл раствора В₁ и наносили на колонку TSK 2000SW (7,5 × 600 мм). С помощью хроматографа P-3500 элюирующий раствор В₁ подавали на колонку со скоростью 0,5 мл/мин, предварительно пропуская через дегазер. Детекцию осуществляли по оптической плотности элюата при 210 нм с помощью детектора Waters 2489 и с регистрацией на компьютере, снабженном программой МультиХром. Промывку колонки осуществляли этиловым спиртом. С помощью эксклюзионной хроматографии также производили очистку рекомбинантных белков, но в качестве элюирующего выступал раствор F₁ (PBS).

5.2.4 Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

Фракции, полученные после эксклюзионной хроматографии, разделяли на аналитической колонке Vydac 218TP54 C₁₈ (4,6 × 250 мм) с использованием градиентного хроматографа Waters 1525, оснащенного детектором Waters 2489. Для хроматографии использовались растворы А₁ и В₂. Образцы наносились на колонку, переведенную в стартовый раствор А₁. Разделение проводили в линейном градиенте раствора В₂: от 0 до 60% в течение 60 или 90 мин при комнатной температуре и скорости потока 1,0 мл/мин. Детекцию осуществляли по оптической плотности элюата при 210 и 280 нм с регистрацией на компьютере, снабженном программой Breeze 2.0.

С целью окончательной очистки выделенных соединений использовали дополнительное разделение с помощью ОФ-ВЭЖХ в измененных условиях: на той же колонке Vydac C₁₈, но с использованием линейного градиента (0–60% за 90 мин) растворов В₃ или В₄. В случае использования раствора В₄ в качестве элюирующего образцы наносились в стартовом растворе А₂.

5.2.5 Масс-спектрометрия

Измерение молекулярных масс пептидов проводили с помощью метода матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) масс-спектрометрии на масс-спектрометре Ultraflex TOF-TOF с идентификацией положительных ионов в линейном и рефлекторном режимах. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксибензойную кислоту (раствор С₁) или α-циано-4-гидроксикоричную кислоту (раствор С₂). На мишени

смешивали равные объемы (по 1 мкл) образцов и раствора матрицы, высушивали на воздухе. Для обработки результатов использовалось программное обеспечение Data Analysis 4.3 и Data Analysis Viewer 4.3.

5.2.6 Определение концентрации полипептидов. УФ-спектрофотометрия

Для получения спектров поглощения веществ в УФ-области их высушивали лиофильно, после чего растворяли в 0,5 мл воды. В работе использовали спектрофотометр UV-1800; длина оптического пути – 1 см, раствором сравнения служила чистая вода.

Концентрацию пептидов определяли по спектру поглощения. Формула (1) использовалась для триптофан-содержащих, формула (2) – для тирозин-содержащих, а формула (3) – для фенилаланин-содержащих полипептидов с известной аминокислотной последовательностью. Для расчета концентрации полипептидов, не содержащих ароматических аминокислотных остатков использовалась формула (4). Для химерной молекулы, имеющей в своем составе флуоресцентный белок и полипептидный токсин, расчет концентрации проводился по пику флуоресцентного поглощения по формуле (5):

$$C_A = (A_{280} - A_{320}) / \epsilon_{280} \quad (1),$$

$$C_A = (A_{274,5} - A_{320}) / \epsilon_{274,5} \quad (2),$$

$$C_A = (A_{257,4} - A_{320}) / \epsilon_{257,4} \quad (3),$$

$$C_P = (A_{214} - A_{320}) / \epsilon_{214} \quad (4),$$

$$C_F = (A_{489} - A_{320}) / \epsilon_e \quad (5),$$

где C_A , C_P и C_F – концентрация моль/л для полипептидов, содержащих ароматические аминокислоты, не содержащих их, и для химеры токсина с флуоресцентным белком, соответственно; A_{214} , $A_{257,4}$, $A_{274,5}$, A_{280} , A_{320} и A_{489} – оптическая плотность раствора при 214, 257,4, 274,5, 280, 320 нм, а также при 489 нм – максимуме поглощения для флуоресцентного белка eGFP, соответственно; ϵ_{214} , $\epsilon_{257,4}$, $\epsilon_{274,5}$, ϵ_{280} и ϵ_{489} – расчетные молярные коэффициенты поглощения полипептидов при 214, 257,4, 274,5, 280 нм, а также при 489 нм – максимуме поглощения для флуоресцентного белка eGFP ($55000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), соответственно.

Расчетные значения молярного коэффициента поглощения при 257,4, 274,5, 280 нм для пептидов с известной аминокислотной последовательностью получали с помощью программы ProtParam tool. Значения молярного коэффициента поглощения при 214 нм рассчитывались по формуле:

$$\epsilon_{214} = \epsilon_p \times n_p + \sum(\epsilon_a \times n_a),$$

где, ε_p – коэффициент поглощения пептидной связи при 214 нм, n_p – количество пептидных связей, ε_a – коэффициент поглощения каждой отдельной аминокислоты при 214 нм, n_a – количество каждого из аминокислотных остатков (391). Значения молярного коэффициента поглощения для химерных молекул, несущих в своем составе флуоресцентные белки были взяты из публикации (392).

5.2.7 Восстановление дисульфидных связей и алкилирование тиольных групп

Высушенные на вакуумном концентраторе фракции растворяли в 40 мкл раствора D₁. Затем добавляли 2 мкл 1 М 1,4-дитиотреитола в изопропанол и тщательно перемешивали. Пробы инкубировали в течение 4 ч при 40°C на твердофазном нагревателе. По окончании реакции к восстановленным образцам добавляли 4 мкл 50%-ного 4-винилпиридина в изопропанол. Пробы инкубировали 15-20 мин при комнатной температуре в темноте, после чего проводили хроматографическое разделение продуктов методом ОФ-ВЭЖХ на колонке Jupiter C₅ (4,6 × 250 мм) в линейном градиенте концентрации раствора B₂ (0–60%) в течение 90 мин со скоростью элюции 1,0 мл/мин.

5.2.8 Отщепление N-концевого остатка пироглутаминовой кислоты

У некоторых пептидов была обнаружен остаток пироглутаминовой кислоты, который препятствовал N-концевому секвенированию по Эдману. Для его отщепления 1 нмоль очищенного пептида с заблокированным N-концевым аминокислотным остатком высушивали на вакуумном концентраторе и растворяли в 50 мкл раствора E₁. К образцу добавляли 1 миллиединицу фермента пироглутаматаминопептидазы (ЕС: 3.4.19.3). Образцы инкубировали в течение 4 ч при 75°C, после чего деблокированный пептид выделяли методом ОФ-ВЭЖХ на колонке Vydac C₁₈, используя 60 мин линейный градиент концентрации раствора B₂ (0–60%) со скоростью потока 1 мл/мин.

5.2.9 Определение N-концевой аминокислотной последовательности

Определение N-концевой последовательности очищенных пептидных компонентов проводили методом ступенчатой деградации по Эдману на автоматическом секвенаторе PPSQ-33A по методике фирмы-изготовителя.

5.2.10 Селективный гидролиз полипептидов по остаткам глутаминовой кислоты

Ферментативное расщепление рекомбинантного белка по остаткам глутаминовой кислоты проводили с помощью фермента эндопротеиназы Glu-C (EC: 3.4.21.19) согласно указаниям компании-производителя.

1 нмоль очищенного рекомбинантного белка высушивали на вакуумном концентраторе и растворяли в 20 мкл раствора E₂. В образцы вносили 0,2 мкг фермента и инкубировали в течение 4 часов при 37°C, после чего продукты реакции разделяли с помощью ОФ-ВЭЖХ на колонке Vydac C₁₈ в линейном градиенте раствора B₂ (0–60%) в течение 60 мин, со скоростью элюции 1,0 мл/мин.

5.2.11 Синтез гена, кодирующего химерный белок eGFP-OSK1, методом ПЦР

Ген, кодирующий химерный флуоресцентный белок eGFP-OSK1 (eGFP – усиленный зеленый флуоресцентный белок; OSK1 – блокатор калиевых каналов из яда скорпиона *O. scrobiculosus*), был получен с помощью метода ПЦР. Структура гена предполагала соединение двух «модулей» – флуоресцентного белка и токсина – гибким глицин-сериновым линкером (G₄S)₃. Целевой ген был фланкирован сайтами рестрикции *Nde*I и *Eco*RI, а также в 3'-область был добавлен терминальный кодон.

Плазмидные векторы, кодирующие eGFP и OSK1, были предоставлены к.б.н. М.Е. Матлашевым (группа биологии активных форм кислорода, ИБХ РАН) и к.х.н. Ю.В. Корольковой (лаборатория нейрорецепторов и нейрорегуляторов, ИБХ РАН), соответственно. Для получения целевого гена олигонуклеотиды (праймеры) с перекрывающимися последовательностями были заказаны в компании Евrogen (**Таблица 9**). С использованием праймеров eGFP-f и eGFP-r была произведена ПЦР-амплификация участка гена, кодирующего eGFP. Поскольку праймеры содержали дополнительные участки, где располагались сайты рестрикции и фрагменты линкера, то ген eGFP был «достроен» с 5'- и 3'-концов соответствующими участками. Аналогичную процедуру провели для OSK1. Полученные продукты содержали концевые комплементарные перекрывающиеся участки, кодирующие часть линкера, что позволило получить полноразмерный ген химерного белка eGFP-OSK1 с помощью ПЦР с концевыми праймерами eGFP-f и OSK1-r (**Рисунок 28**). Ген, кодирующий молекулу eGFP без токсина, получали с использованием праймеров eGFP-f и eGFP-s.

Таблица 9. Последовательности олигонуклеотидов, использованных для синтеза генов. Красным цветом выделены участки, соответствующие сайтам рестрикции; зеленым – участки, комплементарные участкам гена eGFP; синим – участки, комплементарные участкам гена OSK1; серым – участки, кодирующие линкер; подчеркнуты участки комплементарности eGFP-г и OSK1-f; двойным подчеркиванием обозначен СТОП-кодон; полужирным обозначен мутантный цитозин (C) – место замены Lys на Glu.

Название	Нуклеотидная последовательность
Праймеры для амплификации модуля eGFP	
eGFP-f	5'-ATATCATATGATGGTGAGCAAGGGCGAG-3'
eGFP-r	5'- <u>CCCGA</u> ACCGCCACCTCCCGAGCCACCGCCTCCCTCGTACAGCTCGTCCAT-3'
eGFP-s	5'-ATC <u>GAATTC</u> ACTCGTACAGCTCGTCCATG-3'
Праймеры для амплификации модуля OSK1	
OSK1-f	5'-CGGGAGGTGGCGGTTCCGGGCGGTGGCGGCTCCGGGGTGATAATAAATGTG-3'
OSK1-r	5'- <u>CGAATTC</u> ACTTAGGTGTGCAATGGCATT-3'

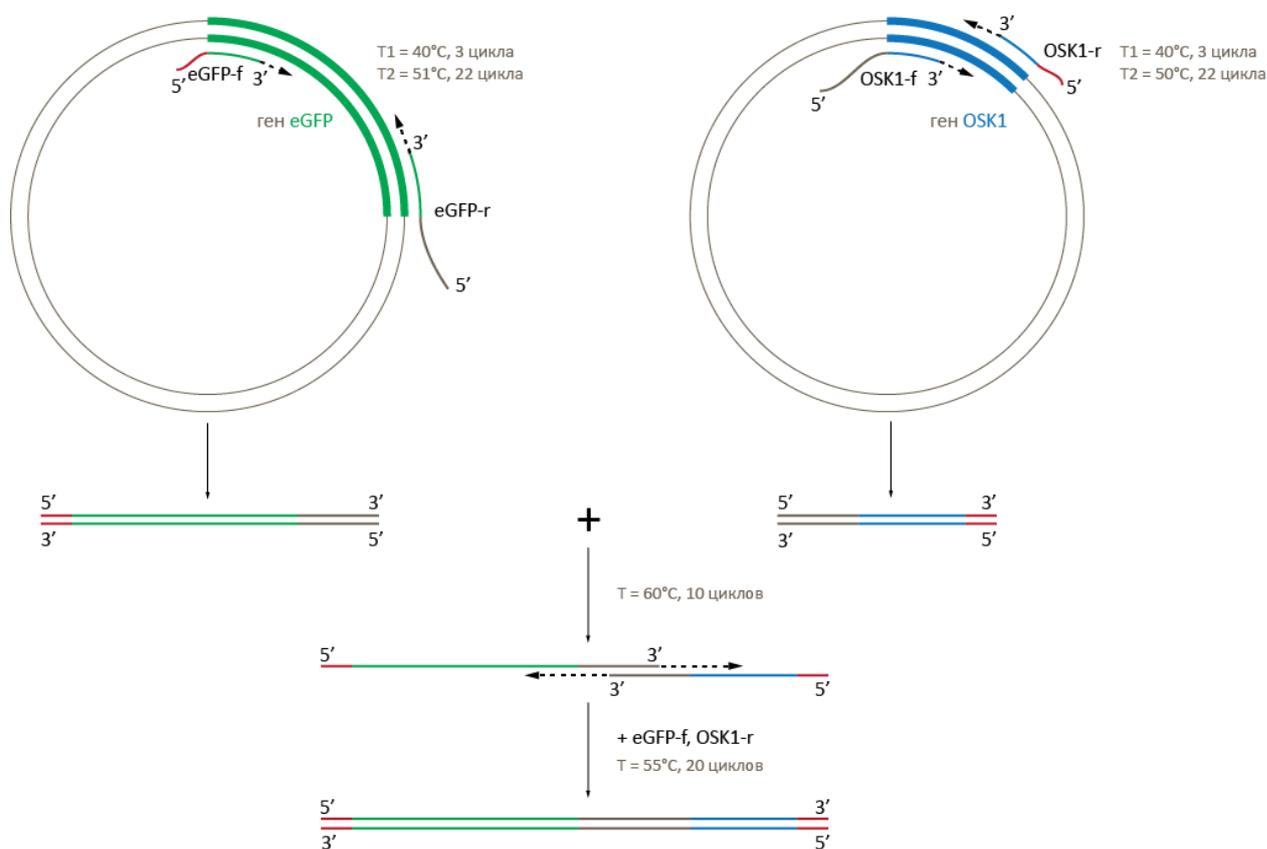


Рисунок 28. Стратегия получения гена eGFP-OSK1 с помощью ПЦР.

ПЦР проводили с использованием ПЦР-амплификатора PTC-200. Реакционная смесь (20–50 мкл) состояла из буферного раствора для ПЦР (G_1), смеси четырех дезоксирибонуклеотидов (0,2 мМ каждого), олигонуклеотидных праймеров (2–5 пмоль каждого), 1–10 нг матричной ДНК и 2,5 ед. Таq-полимеразы. Условия ПЦР: денатурация (95°C) – 20 сек; отжиг (температура рассчитывалась отдельно для каждого праймера: см. **Рисунок 29**) – 20 сек; элонгация (72°C) – 30 сек, 25 циклов.

5.2.12 Осаждение и очистка ДНК

Очистку амплифицированных фрагментов ДНК проводили с помощью набора реактивов GeneJET Purification Kit согласно методическим указаниям производителя (Thermo Scientific).

5.2.13 Рестрикция линейных фрагментов ДНК и плазмиды pET-28a

Рестрикцию проводили в растворе H_1 (буфер Orange), оптимальном для работы эндонуклеаз рестрикции *NdeI* и *EcoRI*. Для расщепления 1 мкг ДНК использовали 2 ед. активности каждого фермента. Стандартная реакционная смесь (10 мкл) содержала 1 мкл 10-кратного буфера H_1 и по 1 мкл стокового раствора каждого фермента. Реакцию проводили в течение часа при 37°C. В качестве контроля проводили рестрикцию плазмиды каждым из ферментов отдельно. Визуализацию прохождения реакции осуществляли с помощью электрофореза контрольных образцов в агарозном геле.

Очистку рестрицированных фрагментов ДНК и вектора проводили с помощью электрофореза в агарозном геле с последующим выделением ДНК из геля с использованием набора реактивов GeneJET Gel Extraction Kit в соответствии с методикой фирмы-производителя (Thermo Scientific).

5.2.14 Электрофорез ДНК в агарозном геле

Использовался 1%-ный агарозный гель с лунками объемом 10, 20 и 50 мкл. На парафиновую пленку Parafilm M наносили 1 мкл раствора для нанесения I_1 . Отбирали 2–5 мкл анализируемого раствора ДНК и смешивали с раствором для нанесения, получившуюся каплю переносили в лунку в геле. Электрофорез проводился в растворе I_2 (буфер TAE) при напряжении 100 В и силе тока 165 мА.

5.2.15 Лигирование линейных фрагментов ДНК и плазмиды pET-28a

Реакционная (лигазная) смесь (20 мкл) содержала: буферный раствор для лигирования (J_1), 10 нг плазмиды, расщепленной по сайтам *NdeI* и *EcoRI*, 10 нг линейных фрагментов ДНК, расщепленных по тем же сайтам рестрикции, и 1 мкл раствора ДНК-лигазы фага T4. Лигазную смесь инкубировали в течение 18 ч при температуре 16°C.

5.2.16 Трансформация *E. coli* методом электропорации

25 мкл размороженных на льду компетентных клеток *E. coli* XL1-Blue помещали в кювету для электропорации и добавляли 1–3 мкл лигазной смеси или 0,5–1 мкл раствора плазмиды. Параметры электроимпульса выставляли согласно рекомендациям фирмы-

производителя электропоратора Eppendorf 2510. После импульса к клеткам сразу же добавляли 300 мкл охлажденной на льду среды LB, суспензию переносили в 1,5 мл-пробирку, инкубировали 5 мин на льду, а затем час при 37°C. Весь объем суспензии переносили на чашку Петри с твердой средой LB с добавлением канамицина (70 мкг/мл – в случае штамма *E. coli* XL1-Blue, 100 мкг/мл – в случае штамма *E. coli* BL21(DE3)) в качестве селективного фактора. Чашки инкубировали при 37°C в течение 18 ч.

5.2.17 Отбор трансформантов с интересующей последовательностью ДНК

Колонии, полученные на селективной среде после проведения трансформации, рассеивались штрихами на новой чашке Петри с твердой средой LB и канамицином (70 мкг/мл). Чашки инкубировали 18 ч при 37°C. Проводили ПЦР со специфичными к интересующей последовательности олигонуклеотидными праймерами, в качестве матрицы использовали тотальную нуклеиновую кислоту из полученной клеточной массы. Стерильными наконечниками переносили клеточный материал (~1 мкл) в пробирку с реакционной смесью (10 мкл), суспендировали клетки и проводили ПЦР. Отобранные трансформанты использовались для получения ночной жидкой культуры. Небольшое количество клеточного материала переносили стерильной петлей в 5 мл жидкой среды LB с добавлением канамицина (70 мкг/мл), суспензию инкубировали 18 ч при 37°C.

5.2.18 Выделение плазмидной ДНК

5 мл ночной культуры *E. coli* центрифугировали при 10000 об/мин на центрифуге Eppendorf 5417R, супернатант сливали. Процедура выделения плазмидной ДНК проводилась с использованием набора реактивов GeneJET Plasmid Miniprep Kit в соответствии с методикой фирмы-производителя.

5.2.19 Секвенирование ДНК

Образцы, содержащие 200 нг очищенной плазмидной ДНК, смешивались с 3 пмоль праймера T7 промотер (#69348-3) или T7 терминатор (#69337-3) и подвергались секвенированию по методу Сэнгера в компании Евроген.

5.2.20 Контролируемая экспрессия гена гибридного белка

Ночную культуру клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных плазмидой с геном химерного белка, разбавляли в 200 раз жидкой средой LB с добавлением канамицина (100 мкг/мл). Клетки инкубировали при 37°C и перемешивании (200 об/мин)

до достижения оптической плотности $OD_{620} \sim 0,4-0,6$, после чего к культуре добавляли индуктор (изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид, ИПТГ) в концентрации 0,5 мМ и инкубировали при комнатной температуре (25°C) в течение 18 ч.

5.2.21 Выделение растворимой фракции белков *E. coli*

После проведения экспрессии клетки (200 мл культуры) осаждали центрифугированием (15 мин, 6500 об/мин на центрифуге Eppendorf 5804R). Клетки ресуспендировали в 35 мл стартового раствора (K_1) для аффинной хроматографии (см. ниже). Разрушение клеточных структур проводилось с использованием ультразвукового дезинтегратора CPX 750 при постепенном увеличении амплитуды от 28 до 34% с шагом в 2%.

5.2.22 Аффинная хроматография

Клеточный лизат наносили в стартовом растворе K_1 на колонку объемом 3 мл со смолой TALON Superflow Metal Affinity Resin со скоростью потока 1 мл/мин. Выделение химерного белка проводили согласно методическим указаниям фирмы-производителя сорбента. Для исключения возможности неспецифической сорбции колонку промывали раствором K_2 . Для получения связавшейся фракции использовали элюирующий раствор K_3 , с высокой концентрацией имидазола. Детекцию осуществляли по оптическому поглощению элюата при 280 нм. После окончания работы колонку со смолой промывали раствором 20 мМ 2-(*N*-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES) и водой.

5.2.23 Электрофорез белков в полиакриламидном геле

Для денатурирующего гель-электрофореза использовали 12%-ный разделяющий полиакриламидный гель (ПААГ) с лунками объемом 15 мкл (Mini-PROTEAN TGX). Электрофорез проводили в электродном растворе L_1 . Перед нанесением в лунки к образцам добавляли буферный раствор L_2 , содержащий краситель, в соотношении 1:1 (v/v) и кипятили на водной бане в течение 15 мин. После окончания электрофореза проводили окрашивание белков с помощью красителя Кумасси R-250. Окрашивание гелей проводили в течение часа в растворе красителя L_3 . Отмывку от избытка красителя проводили в нескольких сменах раствора L_4 .

5.2.24 Приготовление сферопластов с гибридными KcsA-K_v каналами

Все эксперименты по приготовлению сферопластов, несущих гибридные KcsA-K_v каналы, а также измерения, сделанные с помощью них, были выполнены в сотрудничестве

с группой нанобиоинженерии и лабораторией оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН.

Из клеток *E. coli* BL21(DE3), экспрессирующих гибридные каналы KcsA-K_v1.1 или KcsA-K_v1.3 на поверхности внутренней мембраны, были приготовлены сферопласты методом разрушения внешней мембраны лизоцимом. Эксперименты по связыванию различных лигандов с гибридными каналами KcsA-K_v1.1 и KcsA-K_v1.3 проводили в буферном растворе F₂ с конечной концентрацией 10³ клеток/мл. Сферопласты инкубировали в течение 1 ч с тестируемым образцом (цельный яд, фракции яда или индивидуальный компонент) при перемешивании и 23°C. Затем образцы помещали в 12-луночную силиконовую камеру flexiPERM со стеклянным дном для осаждения клеток центрифугированием (в течение 6 мин при 200×g) и переносили под микроскоп для анализа (см. ниже).

Тестирование активности образцов по отношению к гибридным каналам проводили методом конкурентного вытеснения R-AgTx2 (9,0 нМ) из комплексов с KcsA-K_v1.1 и KcsA-K_v1.3. Эксперименты по связыванию eGFP-OSK1 с гибридными каналами также проводились в буферном растворе F₂ с раститровкой исследуемого флуоресцентного белка. Конкурентное вытеснение eGFP-OSK1 (~10 нМ) проводили с помощью классических поровых блокаторов: ТЭА, AgTx2 и OSK1.

5.2.25 Электрофизиологические исследования

Электрофизиологические исследования проводились в сотрудничестве с лабораторией токсикологии Университета г. Лёвен, Бельгия. Для экспрессии различных изоформ α -субъединицы K_v каналов (rK_v1.1, rK_v1.2, hK_v1.3, rK_v1.4, rK_v1.5 и rK_v1.6, где (r)at – канал крысы, (h)uman – канал человека) в ооцитах *Xenopus laevis* соответствующие гены были клонированы в составе плазмиды pSP64T. Далее плазмиду линеаризовали по сайтам рестрикции *EcoRI* (rK_v1.1), *SphI* (rK_v1.2), *NotI* (hK_v1.3 и rK_v1.4), *SalI* (rK_v1.5), *NdeI* (rK_v1.6). Кэпированные мРНК синтезировались с помощью системы для транскрипции mMESSAGE mMACHINE T7. 50 нл раствора РНК, кодирующей α -субъединицы 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 для инкубации F₃ (ND96).

Эксперименты по установлению физиологической активности соединений на ооцитах, экспрессирующих каналные белки, проводились методом двухэлектродной фиксации потенциала на электрофизиологической установке Geneclamp 500. Все измерения проводились при комнатной температуре (18–22°C). Обработка полученных результатов проводилась с использованием программы Origin.

5.2.26 Получение клеток НЕК293Т, временно экспрессирующих hK_v1.3

Введение клеточной линии НЕК293Т осуществлялось в культуральных флаконах объемом 25 см² в СО₂ инкубаторе МСО-15АС. Затем клетки помещались в ростовую среду DMEM (ПанЭко) с содержанием 10% FBS (РАА Laboratories GE), а также антибиотика гентамицина в концентрации 50 мкг/мл и антимикотика амфотерицина В в концентрации 2,5 мкг/мл. За день до проведения трансфекции клетки были перенесены в чистый флакон с новой питательной средой. Для проведения трансфекции клетки были перенесены в 6-луночную пластиковую плашку по 25000–50000 клеток в каждую лунку. К клеткам добавлялась смесь плазмидной ДНК (вектор pcDNA 3.1 с геном hK_v1.3) с трансфицирующим агентом – липофектаминол. Конечная концентрация плазмидной ДНК составила 0,5 мкг/мл, а липофектамина – 2,5 мкг/мл, согласно рекомендациям компании-производителя трансфектанта (Invitrogen). Трансфицированные клетки выращивались при 37°C в СО₂ инкубаторе в течение 48 ч.

5.2.27 Приготовление срезов мозжечка крысы и гистохимическое окрашивание

Все эксперименты с лабораторными животными были проведены в соответствии с положениями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей. Работа по получению срезов мозжечка крысы и их гистохимическому окрашиванию была выполнена в сотрудничестве с лабораториями гормональных регуляций ИБР РАН и лиганд-рецепторных взаимодействий ИБХ РАН.

Самку крысы линии Wistar возрастом 3 дня декапитировали и изолировали головной мозг. Мозжечок, отделенный от переднего мозга, был помещен в 15%-ный раствор желатина. После застывания желатина образец был перенесен на вибратор в растворе F₄ (раствор Кребса-Рингера).

Фронтальные вибраторные срезы мозжечка крысы толщиной 200 мкм были помещены в раствор F₁ с добавлением 50 нМ eGFP-OSK1 или eGFP. Образцы инкубировали в течение 8 часов при 4°C, после чего к ним добавляли DAPI до конечной концентрации 1 мкг/мл для окрашивания клеточных ядер. Срезы отмывали раствором F₁ и фиксировали 4%-ным параформальдегидом в течение 1 ч при 4°C с последующей отмывкой.

5.2.28 Микроскопия

Измерения на сферопластах проводились с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 710 с 63-кратным масляно-иммерсионным объективом α Plan-Apochromat с числовой апертурой 1,46. Полученные флуоресцентные изображения обрабатывали с использованием программы ImageJ. С учетом площади отдельной клетки определялась средняя интенсивность флуоресценции, которая пропорциональна количеству флуоресцентного агента (R-AgTx2 или eGFP-OSK1) в комплексах с гибридными белками на поверхности сферопластов. Для анализа использовалась выборка данных, полученная не менее, чем от 100 клеток. Среднюю интенсивность флуоресценции на мембране клеток (I_{cp}) и стандартное отклонение этого значения рассчитывали с учетом нормировки на мощность лазера. Срезы, полученные на вибраторе, после инкубации с eGFP-OSK1 анализировались с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus IX71 с использованием комбинации фильтров на 460-495 и 510-550 нм.

5.2.29 Приготовление лимфоцитов для фенотипического анализа

Все эксперименты по приготовлению лимфоцитов и их фенотипической характеристике были выполнены в сотрудничестве с лабораторией биокатализа ИБХ РАН. Мононуклеарная фракция клеток была изолирована центрифугированием из периферической крови мыши линии ICR (CD-1) с помощью раствора для выделения на основе фиколла Ficoll Paque Plus. Клетки были отмыты и подвержены стимуляции в течение ночи с помощью PMA в концентрации 10 нг/мл и иономицина в концентрации 1,34 мкМ в питательной среде RPMI. После отмывки клетки были перенесены в 6-луночные плашки с добавлением интерлейкина-2. Через 1 неделю клетки подвергали активации с помощью Dynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28 в течение 72 часов, а затем снова отмывали и культивировали еще 1 неделю с добавлением интерлейкина-2. Проводили очередной раунд активации с помощью PMA/иономицина, как описано выше. Фенотипическую характеристику проводили после девяти дополнительных дней инкубации с интерлейкином-2.

Клетки были отмыты дважды и ресуспендированы в растворе F_1 (PBS) до конечной концентрации 10^7 клеток/мл. К каждой аликвоте (100 мкл) был добавлен соответствующие флуоресцентные вещества (eGFP-OSK1 или eGFP) до конечной концентрации 100 нМ. Образцы выдерживались 30 мин при 4°C. После отмывки образцы инкубировались с антителами к CD8 (1 мг/мл) с флуоресцентной меткой PerCP-Cy5.5 в течение 30 мин при 4°C с последующей отмывкой.

5.2.30 Проточная цитометрия

Эксперименты, в которых использовался проточный флуориметр, были выполнены на базе центра коллективного пользования ИБХ РАН. Фенотипический анализ мононуклеарной фракции крови мыши был проведен с помощью проточного флуориметра Cytomics FC. Полученные данные анализировались с помощью программного обеспечения Kaluza 1.3.

5.2.31 Молекулярное моделирование

Модель молекулы eGFP-OSK1 была построена с помощью оболочки UCSF Chimera 1.10.1 для программы Modeller 9.14 с использованием пространственных структур eGFP (PDB ID: 2Y0G) и OSK1 (PDB ID: 1SCO) в качестве шаблона. *N*-Концевой участок eGFP-OSK1 и (G₄S)₃-линкер между модулями eGFP и OSK1 были представлены в неупорядоченной конформации. Сравнение пространственных структур OSK1 из полученной модели eGFP-OSK1 и ChTx из пространственной структуры комплекса с химерой K_v1.2-K_v2.1 (PDB ID: 4JTA) было произведено с помощью PyMOL 1.7.4.

РЕЗУЛЬТАТЫ

6.1 Создание специализированной базы данных КТх – Kalium

Как уже отмечалось ранее, яд скорпионов – один из наиболее богатых источников лигандов K^+ каналов. По данным UniProt из 400 известных полипептидов, активных на K^+ каналы, 250 – токсины из яда скорпионов (КТх) (см. раздел 3.2.2.6). В основе классификации КТх лежит единая система, разработанная Я. Титгатом и Л. Поссани (297). Классификация базируется на структурно-функциональных особенностях токсинов (см. раздел 3.2.2.6.1), а в названии каждого КТх используется следующий код: x -КТх $y.z$, где x – семейство, базирующееся на структуре (α , β и т.д.), y – подсемейство на основе гомологии с существующими подсемействами (1, 2 и т.д.), а z – номер каждого токсина в подсемействе в порядке открытия пептида. Например, харибдотоксин (ChTx) в рамках данной номенклатуры называется α -КТх 1.1 (семейство α -КТх, подсемейство 1, первый представитель).

6.1.1 Сбор данных и разработка интерфейса

Общая стратегия разработки базы данных включала следующие этапы: сбор аминокислотных последовательностей КТх, удаление из базы данных токсинов с неполной аминокислотной последовательностью, удаление последовательностей, подтвержденных только транскриптомными данными (без данных на уровне полипептидных последовательностей), классификация токсинов, принадлежащих к семейству β -КТх, выделение токсинов с мотивом ИСК в новое семейство – λ -КТх. Данные об аминокислотных последовательностях КТх, ссылки на разрешенные пространственные структуры токсинов и локализация дисульфидных связей были получены из базы данных UniProt.

КТх с неполными аминокислотными последовательностями были удалены из Kalium, так как они, во-первых, не могут быть использованы в дальнейших исследованиях, а во-вторых, вносят беспорядок в существующую систему классификации. Последовательности, полученные при транскриптомном анализе ядовитых желез скорпионов без последующего подтверждения на полипептидном уровне, также были удалены. Во-первых, такие последовательности не представляют особого интереса для исследователей, во-вторых, часть последовательностей, полученных только на транскриптомном уровне, была включена в систему классификации, а часть – нет, что кажется нелогичным, в-третьих, число транскриптомных исследований растет очень

быстро, но обработка данных, полученных в ходе этих исследований, остается на низком уровне.

Токсинам, входящим в семейство β -КТх, были даны соответствующие названия (по аналогии с α -КТх): β -КТх 1.1, β -КТх 1.2 и т.д. Новое семейство λ -КТх объединило токсины с мотивом ИСК (см. раздел 3.2.2.6.1). Графическое представление стратегии создания базы данных Kalium (www.kaliumdb.org) приведено на **Рисунке 29**.

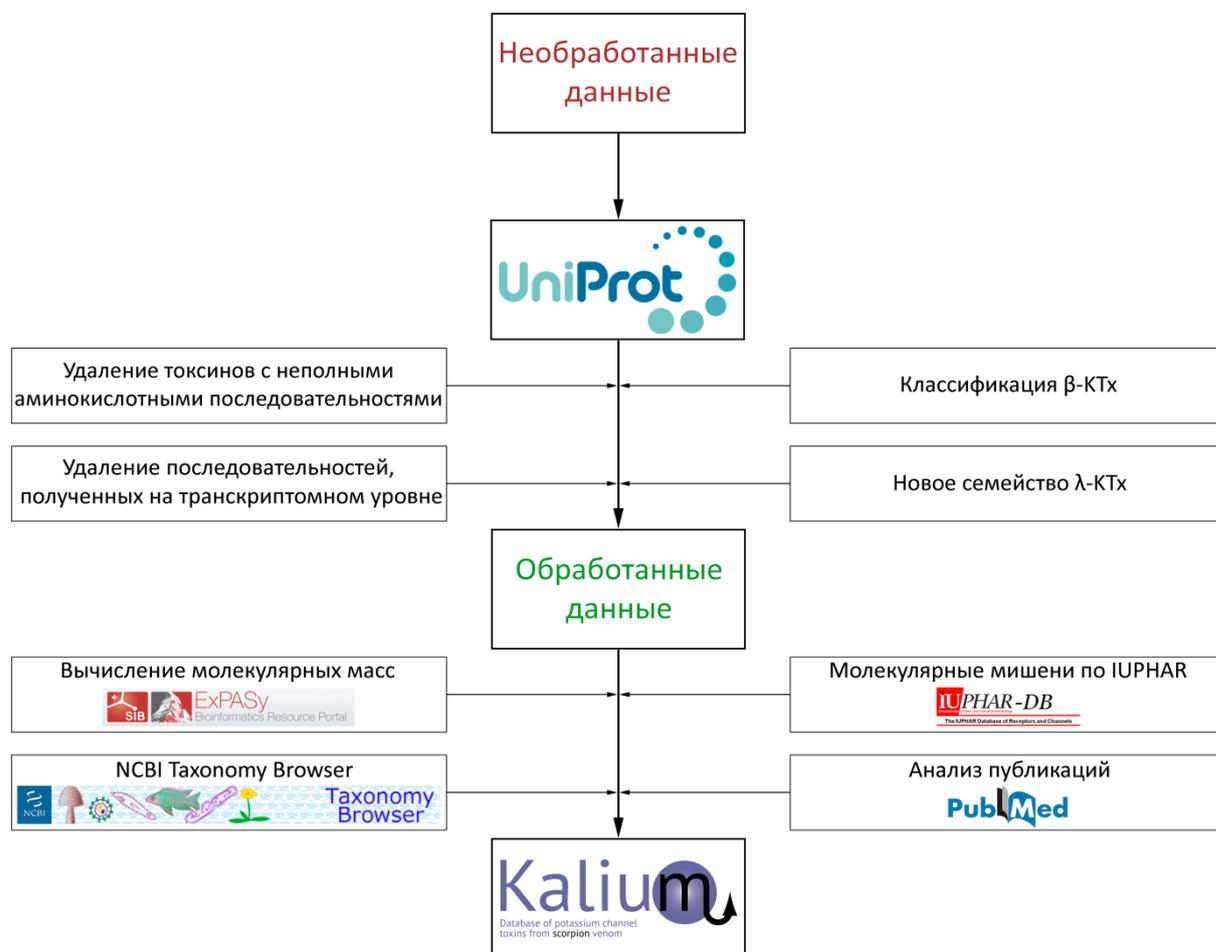


Рисунок 29. Графическое представление стратегии создания базы данных Kalium.

Для каждой актуальной записи была рассчитана молекулярная масса с учетом посттрансляционных модификаций (отщепление сигнального и про- пептидов, циклизация *N*-концевого глутамина, *C*-концевое амидирование и замыкание дисульфидных связей). К латинским названиям скорпионов были добавлены ссылки на соответствующий вид в системе NCBI Taxonomy Browser. Данные по активностям КТх и ссылки на публикации в PubMed были добавлены в Kalium вручную. Названия молекулярных мишеней (K^+ каналов) приведены согласно рекомендациям Международного союза фундаментальной и клинической фармакологии (IUPHAR).

6.1.2 Структура и особенности базы данных Kalium

Главная страница Kalium представлена одной интерактивной таблицей, в которой собрана вся информация о КТх. Ссылки на разделы «Help» (Помощь) и «About & Contact» (О Kalium и Контакты) располагаются в правой верхней части страницы; под ними находится строка поиска. Элементы управления, позволяющие выполнять фильтрацию и сортировку интересующей информации, расположены в заголовках столбцов таблицы (**Рисунок 30**):

Selection (Выбор) – позволяет выбирать одну или несколько записей и отправлять соответствующие им аминокислотные последовательности на сервер Clustal Omega (соответствующая кнопка). Чтобы выбрать все записи, а также снять выбор необходимо нажать на селектор в заголовке столбца.

Organism (Организм) – латинские названия видов скорпионов согласно современной классификации. Нажатие на заголовок столбца открывает меню, в котором пользователь может выбрать один или несколько видов интересующих скорпионов для фильтрации отображаемых данных. Латинские названия скорпионов связаны с NCBI Taxonomy Browser.

Name (Имя) – токсины сгруппированы по семействам и подсемействам согласно обновленной классификации Я. Титгата и Л. Поссани. Из выпадающего меню в заголовке столбца пользователь может выбрать одно или несколько семейств. Карточки токсинов (см. ниже) отрываются, если нажать на соответствующие имена токсинов.

Synonyms (Синонимы) – тривиальные названия токсинов. Большинство ученых знают соответствующие токсины под их тривиальными названиями, например харибдотоксин (ChTx) и калиотоксин (КТХ). Поле в заголовке этого столбца можно использовать для поиска токсинов по тривиальным названиям.

UniProt ID (Идентификатор аминокислотной последовательности в базе данных UniProt) – показан идентификатор в UniProt, нажатие на который отправляет пользователя на соответствующую страницу в UniProt.

Sequence (Аминокислотная последовательность) – аминокислотная последовательность зрелого токсина, представленная в однобуквенном коде. Остатки цистеина обозначены цветом, одинаковый цвет обозначает образование соответствующими цистеинами дисульфидной связи.

PDB (PDB ID) – Показывает идентификатор PDB для КТх с разрешенной пространственной структурой; нажатие на соответствующую запись отправляет пользователя на страницу данного токсина в базе данных пространственных структур

(RCSB Protein Data Bank). С помощью значка «фильтр» можно отобразить только те записи, для которых пространственная структура разрешена.

Mass (Молекулярная масса) – молекулярные массы зрелых токсинов, рассчитанные с учетом посттрансляционных модификаций.

Publication Date (Дата публикации) – год, когда информация о данной молекуле была опубликована впервые.

Activity Data (Данные об активности) – информация об активности на различные изоформы K^+ каналов. Показаны все мишени, на которых производились измерения. При нажатии на соответствующие записи открываются карточки токсинов, где представлена детальная информация. Заголовок этого столбца можно использовать для отображения токсинов с интересующей активностью.

Organism	Name	Synonyms	UniProt ID	Sequence	PDB	Mass	Pub. Date	Activity
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Leirus quinquestriatus hebraeus</i>	α -KTx 1.1	CHTx; CHTx-Lq1, ...	P13487	ZFTIVSCTTSKSEWVSCRLHNTSRGFCNNGFCYYS	1BAH, 1CMR	4295.05	1990-01-01	Shaker, Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.5, Kv2.1, K
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Leirus quinquestriatus hebraeus</i>	α -KTx 1.2	CHTx-Lq2; CHTx-d, ...	P45628	ZFTQESCTASHQNSICRLHNTNRGFCNNGFCYYS	1LIR	4335.08	1995-11-01	Kv1, KCa1.1
<input type="checkbox"/> <i>Mesobuthus tamulus</i>	α -KTx 1.3	IbTx; Iberiotoxin	P24663	ZFTDVKCTSVSKEWVSCDLFGVDRGFCMNGFCYVQ		4230.02	1992-03-01	KCa1.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Mesobuthus martensii</i>	α -KTx 1.5	BmTX1; Neurotoxin...	Q9NII6	ZFTDVKCTGSKEWVSCQKQGFQGFNGFCNNGFCYYS	1BIG	4169.04	2001-12-19	Kv1, Kv1.3, KCa1.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Mesobuthus martensii</i>	α -KTx 1.6	BmTX2; Neurotoxin...	Q9NII5	ZFTDVKCTGSSQWVSCKLFQGVDRGFCMNGFCYYS	2BMT	4178.97	2002-01-23	Kv1, Kv1.3, Kv1.1, KCa1.1
<input type="checkbox"/> <i>Parabuthus transvaalicus</i>	α -KTx 1.10	PBTx3; Parabutoxin-3	P83112	EVDNRCTSSKSEWVSCQKATGRFNGFCMNRGFCYFR		4274.23	2001-12-19	Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.1.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Centruroides noxius</i>	α -KTx 1.11	SloTx; Slotoxin	P0C182	TFTDVKCTVSKSEWVSCAAAFVDRGFCMNGFCYV		4085.98	2006-03-21	KCa1.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Mesobuthus eupeus</i>	α -KTx 1.16	Toxin MeKTx11-1	C0HJQ8	ZFTDVKCTGTCWVSCNPFVGRMFGFNGFCNNGFCYFP		4221.16	2015-05-27	Kv1.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Mesobuthus eupeus</i>	α -KTx 1.17	Toxin MeKTx11-3	C0HJQ7	ZFTDVKCTVTVKSEWVSCNPFVGRMFGFNGFCNNGFCYYS		4253.21	2015-05-27	Kv1.1
<input type="checkbox"/> <i>Centruroides noxius</i>	α -KTx 2.1	NTx; Noxiustoxin, ...	P08815	TIINVKCTSPKSEWVSCDLVGGSSAGAKCNGFCYVNH ₂	1SXM	4195.06	1988-11-01	Shaker, Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.5, KCa1.1
<input type="checkbox"/> <i>Centruroides margaritatus</i>	α -KTx 2.2	MgTX; Margatoxin	P40755	TIINVKCTSPKSEWVSCDLVGGSSAGAKCNGFCYVPH	1MTX	4179.11	1995-02-01	Shaker, Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3
<input type="checkbox"/> <i>Centruroides limpidus limpidus</i>	α -KTx 2.3	ClITx1; Toxin I, To...	P45629	TIINVKCTSPKSEWVSCDLVGGSSAGAKCNGFCYVPH		4191.06	1995-11-01	Kv1
<input type="checkbox"/> <i>Centruroides noxius</i>	α -KTx 2.4	NTx-2; NTx2; Noxi...	Q9TXD1	TIINVKCTSPKSEWVSCDLVGGSSAGAKCNGFCYVNS		4183.05	2003-09-26	Kv1
<input type="checkbox"/> <i>Centruroides limbatulus</i>	α -KTx 2.5	HgTX1; Hongotoxin-1	P59847	TVIDVKCTSPKSEWVSCDLVGGSSAGAKCNGFCYVPH	1HLY	4220.20	2003-09-19	Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.6
<input type="checkbox"/> <i>Centruroides limpidus limpidus</i>	α -KTx 2.7	ClITx2; Toxin II, To...	P45630	TVIDVKCTSPKSEWVSCDLVGGSSAGAKCNGFCYVNS		3905.82	1995-11-01	Kv1
<input type="checkbox"/> <i>Centruroides elegans</i>	α -KTx 2.8	Toxin Ce1	P0C161	TVIDVKCTSPKSEWVSCDLVGGSSAGAKCNGFCYVNH		4254.17	2006-03-07	Kv1.3
<input type="checkbox"/> <i>Centruroides elegans</i>	α -KTx 2.9	Toxin Ce2	P0C162	TIINVKCTSPKSEWVSCDLVGGSSAGAKCNGFCYVNH ₂		4267.22	2006-03-07	Kv1.3

Рисунок 30. Главное окно Kalium. В заголовке странице представлены: логотип базы данных, выполняющий функцию кнопки «Help», а также ссылки на разделы «About & Contact». Под заголовком располагается индикатор, отображающий общее количество записей, а также количество записей, которые выбраны в данный момент. Справа находятся кнопка Clustal и строка поиска по всей базе данных. База данных представлена таблицей из 10 столбцов (см. раздел 6.4.3).

Для каждого токсина детальная информация представлена в «карточке токсина» (Рисунок 31). Здесь дублируется вся информация, имеющаяся в главной таблице, а также добавляются новые данные, такие как:

Permanent link (Постоянная ссылка) – прямая ссылка на карточку токсина, которая может быть использована для цитирования.

Raw Sequence (Необработанная последовательность) – представлена аминокислотной последовательностью предшественника без каких-либо посттрансляционных модификаций.

α-KTx 3.7

Permanent Link: <http://kaliumdb.org/alpha/3/7>

Organism: *Orthochirus scrobiculosus*

Name: α-KTx 3.7

Synonyms: OsK1, OsK-1

UniProt ID: P55896

Sequence: GVIIINVTGRISRCLEPCKKAGNRFGKQNGRQKTFK

PDB: 1SCO_2CK4_2CK5

Mass: 4205.30

Publication Date: 1997-11-01

Last Modified: 2015-01-07

Target Channel	Data Type	Method Type	Test System	Speci...	Value, nM	Ref
Kv1.1	IC50	patch	mammal	mouse	0.6	PM: 15588251
Kv1.2	IC50	patch	mammal	human	5.4	PM: 15588251
Kv1.3	IC50	patch	mammal	mouse	0.014	PM: 15588251
Kv1.4	IC50	patch	mammal	human	>1000	PM: 15588251
Kv1.5	IC50	patch	mammal	human	>1000	PM: 15588251
Kv1.6	IC50	patch	mammal		>1000	PM: 15588251
Kv1.7	IC50	patch	mammal	mouse	>1000	PM: 15588251
Kv3.1	IC50	patch	mammal	mouse	>1000	PM: 15588251
Kv3.2	IC50	patch	mammal	rat	>1000	PM: 16234482
Kv11	IC50	patch	mammal	human	>1000	PM: 15588251

Рисунок 31. Карточка токсина на примере α-KTx 3.7 (OSK1).

Last Modified (Последние изменение) – дата последнего изменения записи.

Данные по фармакологическим активностям собраны в таблицу, состоящую из следующих столбцов:

Target Channel (Мишень) – изоформы K^+ каналов, на которых измерялась активность.

Data Type (Вид данных) – конкретизирует, в каких единицах представлены данные: константа диссоциации (K_d), константа ингибирования (K_i), концентрация полунгибирования (IC_{50}) или полумаксимальная эффективная концентрация (EC_{50}).

Method Type (Метод измерения) – указывает на экспериментальный метод, с помощью которого были получены данные: радиолигандный анализ (radio), методы двухэлектродной (voltage) или локальной (patch) фиксации потенциала.

Test System (Система) – характеризует тип клеточной системы, использовавшейся в исследовании: клетки насекомых (insect), ооциты шпорцевой лягушки (oocyte) или клетки млекопитающих (mammal).

Species (Вид) – конкретизирует виды живых организмов, чьи изоформы K^+ каналов были использованы для измерений. Наиболее распространенные каналы принадлежат мухе, крысе, мышам и человеку.

Value, nM (Значение, нМ) – числовое значение параметра активности (K_d , K_i , IC_{50} или EC_{50}), представленное в нМ. Значения показаны в следующем формате:

x – K_d , K_i , IC_{50} или EC_{50} значения в нМ;

$>x$ – токсин не показал никакого эффекта вплоть до концентрации x ;

x/y – означает, что токсин в концентрации x снижает ионный ток через канал на y процентов.

Ref. (Ссылка на литературу) – ссылки на публикации в системе PubMed.

6.2 Тестирование яда паукообразных на предмет наличия поровых блокаторов K^+ каналов

Цельные яды шести видов скорпионов и 19 видов пауков были протестированы на способность вытеснять агитоксин-2 (AgTx2), меченный 5-карбокситетраметил-родамином (R-AgTx2), из комплексов с гибридными K^+ каналами KcsA- $K_v1.x$ ($x=1$ или 3), экспрессированными на поверхности сферопластов. Образцы, вытесняющие R-AgTx2, содержат потенциальные поровые блокаторы K^+ каналов, конкурирующие за тот же сайт связывания (Таблица 10).

Таблица 10. Тестирование коллекции ядов паукообразных на наличие поровых блокаторов K^+ каналов. +, наблюдалось вытеснение R-AgTx2 из комплексов с гибридными K^+ каналами, –, вытеснения не наблюдалось, †, наблюдался лизис сферопластов.

Организм	Активность на KcsA- $K_v1.x$
Скорпионы	
<i>Androctonus amoreuxi</i>	+
<i>Buthacus arenicola</i>	+
<i>Euscorpium mingrelicus</i>	†
<i>Leiurus quinquestriatus hebraeus</i>	+
<i>Mesobuthus eupeus</i>	+
<i>Orthochirus scrobiculosus</i>	+
Пауки	
<i>Agelena orientalis</i>	–
<i>Agelenopsis potteri</i>	–
<i>Araneus grossus</i>	–
<i>Araneus marmoreus</i>	–
<i>Eresus niger</i>	†
<i>Heriaeus</i> sp.	–
<i>Latrodectus pallidus</i>	†
<i>Latrodectus tadjicus</i>	–
<i>Linothele</i> sp.	–
<i>Micrommata virescens</i>	–
<i>Paracoelotus birulai</i>	–
<i>Pisaura mirabilis</i>	–

<i>Segestria</i> sp.	—
<i>Steatoda</i> sp.	—
<i>Tegenaria agrestis</i>	—
<i>Tegenaria</i> sp.	—
<i>Thanatus</i> sp.	—
<i>Thomisus onustus</i>	—
<i>Tibelus oblongus</i>	—

Яд скорпиона *E. mingrelicus* и пауков *E. niger* и *L. pallidus* показали высокую мембранолитическую активность, поэтому их тестирование по отношению к гибридным KcsA-K_v не проводилось. В яде всех остальных пауков целевой активности обнаружено не было. Яд пяти скорпионов (*A. amoreuxi*, *B. arenicola*, *L. quinquestriatus hebraeus*, *M. eurus* и *O. scrobiculosus*) вытесняли R-AgTx2 из комплексов с гибридными K⁺ каналами, что свидетельствовало о наличии в их составе блокаторов этих каналов. Для дальнейшего исследования был взят яд скорпионов, обитающих на территории России: *M. eurus* и *O. scrobiculosus*.

6.3 Анализ транскриптома ядовитых желез скорпионов *M. eurus* и *O. scrobiculosus*

6.3.1 Составление библиотек кДНК из ядовитых желез *M. eurus* и *O. scrobiculosus*

Библиотеки нуклеотидных последовательностей кДНК из ядовитых желез *M. eurus* и *O. scrobiculosus* были получены с использованием традиционного подхода (393). Общее число последовательностей кДНК в базе данных составило 1911 и 2073, а число мнимых аминокислотных последовательностей – 11 466 и 12 438 (чтобы учесть все возможные варианты, трансляция была осуществлена по трем рамкам считывания в прямом и обратном направлении) для *M. eurus* и *O. scrobiculosus*, соответственно. Для поиска предполагаемых токсин-подобных пептидов, все эти последовательности были перенесены в программу Notepad++ и проанализированы с помощью инструмента поиска по регулярным выражениям. В результате для *M. eurus* было получено 244 потенциальные последовательности, удовлетворяющие условиям поиска для мотива CSα/β, 4 последовательности для мотива ICK и 4 последовательности для мотива CSα/α₂(S-S) (всего последовательностей, удовлетворивших поисковым условиям, – 252). Для *O. scrobiculosus* были найдены последовательности, соответствующие только фолду CSα/β (всего 56 записей). Все эти последовательности были проанализированы с помощью программ SignalP 4.1 и BLAST. Последовательности, которые не содержали сигнального пептида, были удалены из анализа. Оставшиеся 155 и 41 последовательность были

проанализированы с помощью BLAST и Clustal Omega для удаления полностью идентичных записей, в результате чего были получены 133 и 28 уникальных последовательностей предшественников предполагаемых токсинов для *M. eurus* и *O. scrobiculosus*, соответственно. У *M. eurus* 3 последовательности соответствовали молекулам со структурой ICK, а остальные 130 соответствовали структурному фолду CS α / β . У *O. scrobiculosus* все 28 последовательностей соответствовали мотиву CS α / β . Для каждого скорпиона с помощью BLAST последовательности, соответствующие фолду CS α / β , были разделены на четыре группы согласно сходству аминокислотных последовательностей. Для *M. eurus* распределение по этим группам выглядело следующим образом: 56 – КТх, 64 – токсины, действующие на Na⁺ каналы (NaTx), 3 – хлоротоксин-подобные пептиды и 7 последовательностей, не имеющих значимого сходства с известными токсинами. Для *O. scrobiculosus* распределение отличалось и выглядело так: 9 – КТх, 11 – токсины, действующие на Na⁺ каналы, 2 – антимикробные пептиды и 7 последовательностей, не имеющих значимого сходства с известными токсинами. Последовательности, удовлетворяющие мотивам CS α / α 2(S-S) и типа Кунитца не были найдены ни в одном из транскриптомов. Общая стратегия по поиску предполагаемых токсинов по базам данных кДНК из ядовитых желез скорпионов показана на **Рисунке 32**. Все последовательности кДНК, кодирующие потенциальные КТх, были зарегистрированы в базе данных GenBank.

6.3.2 Классификация предполагаемых токсинов и их сравнение с известными КТх

Все последовательности предшественников предполагаемых КТх, полученные из транскриптомного анализа ядовитых желез *M. eurus*, были проанализированы с помощью программы Clustal Omega и разделены на 30 групп (от одного до четырех членов в каждой группе) согласно сходству аминокислотных последовательностей. Предполагаемые предшественники токсинов получили название рМеКТх, где р обозначает «предшественник» (от англ. precursor), Ме – *M. eurus*, КТх – токсины из яда скорпионов, блокирующие K⁺ каналы. Для некоторых предшественников невозможно было предсказать процессинг сигнального пептида одним единственным способом, поэтому было предложено несколько возможных альтернатив. Например, в случае рМеКТх1-1 SignalP показал, что сигнальный пептид заканчивается Thr19 или Ala28, а наиболее вероятный вариант процессинга – расщепление предшественника после Thr19. Однако, зрелый пептиды, начинающийся с Val29 (альтернативный вариант, предсказанный SignalP), был выделен напрямую из яда *M. eurus* (см. ниже).

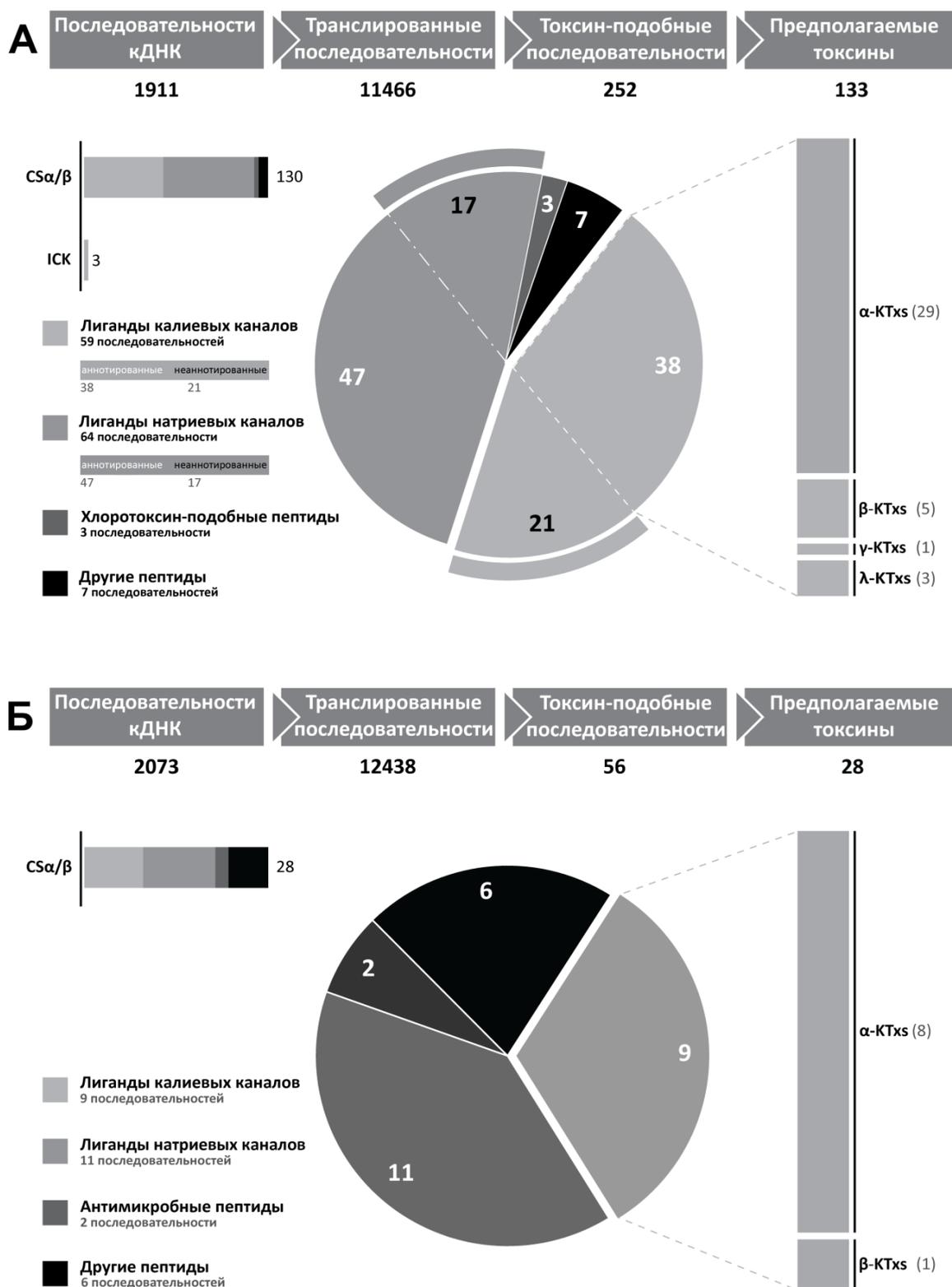


Рисунок 32. Стадии идентификации предполагаемых токсинов в базах данных кДНК из ядовитых желез: А – *M. eurus*, Б – *O. scrobiculosus*; и их распределение среди различных структурно-функциональных групп. Нуклеотидные последовательности после секвенирования были транслированы и проанализированы с помощью регулярных выражений. Токсин-подобные последовательности были идентифицированы по наличию сигнального пептида. Согласно сходству аминокислотных последовательностей предполагаемые токсины были разделены на четыре группы (КТх, NaТх, хлоротоксин-подобные или антимикробные пептиды и пептиды, не имеющие значимого сходства с известными токсинами) в случае каждого скорпиона. Для каждой группы показано общее число найденных последовательностей. Справа показано количество блокаторов калиевых каналов и их распределение по семействам.

Для двух предшественников рМеКТх8-1 и рМеКТх20-1b сигнальный пептид не был обнаружен программой SignalP (в обоих случаях не был найден предполагаемый сайт процессинга). Однако, для этих последовательностей существование сигнального пептида было предсказано по гомологии с другими рМеКТх. Кроме того, эти последовательности обладали всеми признаками токсин-подобных пептидов и поэтому не были удалены из анализа. Все новые последовательности были проанализированы с помощью BLAST для поиска гомологичных пептидов, и токсины из публичных баз данных, которые показали наибольший процент сходства, отображены в **Таблице 11**. Большинство этих токсинов – представители описанных подсемейств КТх, таких как α -КТх 1, β -КТх 1, γ -КТх 2 и др. Некоторые рМеКТх идентичны пептидам, найденным в транскриптомах скорпионов семейства Buthidae, но не выделенным напрямую из яда. Небольшое количество предполагаемых КТх показали низкий процент сходства с известными токсинами из UniProt или даже его отсутствие.

Последовательности предшественников КТх, полученные из транскриптомного анализа ядовитых желез *O. scrobiculosus*, также были проанализированы с помощью программы Clustal Omega. Количество групп, основанное на сходстве аминокислотных последовательностей, в этом случае составило 7 (от одного до двух членов в каждой группе). Предполагаемые предшественники токсинов были названы аналогичным образом с рМеКТх: рОсКТх. Для анализа последовательностей рОсКТх использовались подходы, идентичные подходам, описанным выше. Так, в случае рОсКТх3-1 SignalP показал, что сигнальный пептид заканчивается Thr19 или Val28, а наиболее вероятный вариант процессинга – расщепление предшественника после Thr19. Однако, зрелый пептид, начинающийся с Val29 (альтернативный вариант, предсказанный SignalP), был выделен напрямую из яда *O. scrobiculosus* (см. ниже). Все установленные последовательности предполагаемых КТх из транскриптома ядовитых желез *O. scrobiculosus* представлены в **Таблице 12**.

Таблица 11. Предполагаемые предшественники КТх из транскриптома *M. eureus*. Предшественники предполагаемых КТх были разделены на 30 групп по сходству аминокислотных последовательностей. Наиболее сходные последовательности КТх из *M. eureus* и других видов скорпионов – известные ранее, показаны в каждой группе для сравнения. Предсказанные сигнальные пептиды обозначены подчеркиванием. Пунктирные линии обозначают альтернативный вариант процессинга сигнальных пептидов. Пропептиды выделены курсивом. Различающиеся аминокислотные остатки обозначены серым цветом. ○ – зрелый пептид был идентифицирован впервые в этой работе, ▲ – ранее, ● – ранее и в этой работе.

Название	ID	Сравнение аминокислотных последовательностей	Идентичность, %	Семейство КТх
pMeKTx1-1	KF612499	● <u>MSRLYAIILIALVFNVIMT</u> IMPDMKVEAVSCEDCPEHCATKDQRAKCDNDKCVCEPK		α-KTx 8
pMeKTx1-2	KF612500	○ <u>MSRLYAIILIALVFNVIMT</u> IMPDMKVEAVSCEDCPEHCATKDQRAKCDNDKCVCEPK	96	
MeuTXKa1	EF442060	● <u>MSRLYAIILIALVFNVIMT</u> IMPDMKVEAVSCEDCPEHCATKDQRAKCDNDKCVCEPK	100	
pMeKTx2-1	KF612501	<u>MSRLFTLVLIIVL</u> LAMNVMMAIISDPVVEAVGC-EECPPMYCKGKNAVPTCDGGVNCNA		α-KTx 9
pMeKTx2-2	KF612503	<u>MSRLFTLVLIIVL</u> LAMNVMMAIISDPVVEAVGC-EECPPKYCKGKNAVPTCDGGVNCNA	98	
pMeKTx2-3	KF612502	<u>MSRLFTLVLIIVL</u> LAMNVMMAIISDPVVEAVGC-EECPPVYCKGKNAVPTCDGGVNCNA	95	
pMeKTx2-4	KF612504	<u>MSRLFTLVLIIVL</u> LAMNVMMAIISDPVVEAVGC-EECPPMHCKGKNAVPTCDGGVNCNV	73	
BmKK6	Q9NJP7	<u>MSRLFTLVLIIVL</u> LAMNVMMAIISDPVVEAVGC-EECPPMHCKGKNAVPTCDGGVNCNV	95	
MeuKTx-5	P86398	▲ -----VGC-EECPPMHCKGKNAVPTCDNGVNCNA	93	
pMeKTx3-1	KF612534	<u>MNRLCKITVMFLV</u> LNAIIAIISETKVEAATCGYHDCVLYCQMFQGGKCRDYLCDCEKGRSNE		α-KTx 19
BmP01	Q9U8D2	<u>MSRLYAIILIALVFNVIMT</u> IMPDMKVEAATC--EDCPEHCATQNAARAKCDNDKCVCEPK-----	39	
pMeKTx4-1	KF612520	<u>MSRIFTIILIVFAL</u> NIISLSNFKIEAAACYSDDCRVKCVAMGFSSGKINSKCKCYK		α-KTx 26
BmBKTx1	P83407	-----AACYSDDCRVKCVAMGFSSGKINSKCKCYK	100	
pMeKTx5-1	KF612524	<u>MMSRLSVFIIIALV</u> LSVIIIDVLNNSKVEGACVENCREYCAKAGARNGKINSNCHCYY		α-KTx 17
BmK86	A7KJJ7	<u>MSRLFVFIILIALF</u> LSAIIIDVMSNFKVEGACSKPKRKYCIDKAGARNGKINSRCHCYY	75	
pMeKTx6-1	KF612535	<u>MRRIYSVVLVLI</u> ALGAIITDITTSARIIAHDENYCSIAICINKNATFVSCDGGYCVCKVKECH		α-KTx 5
pMeKTx6-2	KF612536	<u>MRRIYSVVLVLI</u> ALGAIITDITTSARIIAHDENYCSISICINKNATFVSCDGGYCVCKVKECH	98	
pMeKTx6-3	KF612537	<u>MRRIYSVVLVLI</u> ALSARIDITTVSRVIEHGCYYCSISICINKNATFVSCDGGYCVCKVKECH	87	
pMeKTx6-4	KF612538	<u>MRRIYSVVLVLI</u> ALRAIRDISPVSRVIEHGCYYCSISICINKNATFVSCDGGYCVCKVKECH	82	
pMeKTx7-1	KF612507	<u>MKFIIVLILISVLI</u> ATTVPVSEAQRQCQTVQDCYKYCMTPKRCTYGTCCYCPSPFK		α-KTx 16
pMeKTx7-2	KF612508	<u>MKFIIVLILIGVLI</u> ATTVPVSEAQRQCQTVRDCYKHCCQSPKRCTLTGTCYCEPSPGK	82	
pMeKTx7-3	KF612506	<u>MKFIIVLILISVLI</u> ATTVPVSEAQRQCQHVRNCKYKCESPEKQFGTCYCKP-PGK	76	
pMeKTx7-4	KF612505	<u>MKFIIVLILISVFI</u> ATVPVSESONQCQTVRDCQPYCATPDRCLYGTCCYCKT-TGK	73	
BmKK4	Q95N18	<u>MKFIIVLILISVLI</u> ATVPVNEAQTCCQSVRDCQYCLTPDRCSYGTCCYCKT-TGK	80	
pMeKTx8-1	KF612489	<u>MNNYYKIVLIMVA</u> FAVTTITFSNIHVEGIIICNLRRQCQLSCRSGLLGGKICIGDKCECVKHGK		α-KTx 1
BmP05	Q9TVX3	<u>MNNYYKIVLIMVA</u> FAVTTITFSNIQVEGAVCNLKRQCQLSCRSGLLGGKICIGDKCECVKHGK	90	
pMeKTx9-1	KF612515	<u>MKNYCGIILFLAI</u> ISATGVFCVDFPNKGGKCDLKECRKTCCKLNYRGKCFPNYCRCPG		α-KTx 1
pMeKTx9-2	KF612516	<u>MKNYCGIILFLAI</u> ISATGVFCVDFPNKGGKCHRKECRKTCCKLNYRGKCFPNYCRCPG	97	
MeuTXKa3	EF442052	<u>MKNYCGIILFLAI</u> ISATGVFCVDFPNKGGKCDRKECRKTCCKLNYRGKCFPNYCRCPG	95	
pMeKTx10-1	KF612490	<u>MKILSIVLIALI</u> ICSIISICTEAFGLIDVKCSASRECWVACKKATGSGQGKQNNQCRCY		α-KTx 1
pMeKTx10-2a	KF612492	<u>MKILSIVLIALI</u> ICSIISICTEAFGLIDVKCSASRECWVACKKATGSGQGKQNNQCRCY	97	
pMeKTx10-2b	KF612491	<u>MKILYVVLVLI</u> ALICSIISICTEAFGLIDVKCSASRECWVACKKATGSGQGKQNNQCRCY	91	
MeuTx3B	F5CJW1	● <u>MKILSIVLIALI</u> ICSIISICTEAFGLIDVKCSASRECWVACKKATGSGQGKQNNQCRCY	98	
pMeKTx11-1	KF612509	○ <u>MKISFLLLLALV</u> ICSIGWSEAQFTDVKCTGSKQCVKQKMPGFRPBGKCMNGKCRCP		α-KTx 1
pMeKTx11-2	KF612510	○ <u>MKISFVLLLA</u> IVICSIGWTEAQTFTVSCSASSQWPCICPKMFGKYRGKCMNGKCRCP	71	
BmTX1	Q9NI16	<u>MKISF-LLLALV</u> ICSIGWSEAQFTDVKCTGSKQCVKQKMPGFRPBGKCMNGKCRCP	93	

Название	ID	Сравнение аминокислотных последовательностей	Идентичность, %	Семейство КТх
pMeKTx12-1 BeKm-1	KF612525 Q9BKB7	<u>MKISFVLLLTFLFICSIGWSEARPTDIKCSSEYQCFFPVCKSRFGKTNGRCVKGFCD</u> ▲ <u>MKISFVLLLTFLFICSIGWSEARPTDIKCSSEYQCFFPVCKSRFGKTNGRCVNGFCD</u>	97	γ-KTx 2
pMeKTx13-1 pMeKTx13-2a pMeKTx13-2b pMeKTx13-2c BmKTX MeuKTx-3	KF612512 KF612527 KF612526 KF612528 Q9NII7 P86396	● <u>MKVFFAVLITLFLVCSMIIGIH-GVGINVKCKHSGQCLKPKCKDAGMRFGKCMNGKCDCTPKG</u> ○ <u>MKMFFAVLITLFLVCSMIIGICEGREIPVKCKGSKQCLQSCKEAGMTYKCMNGKCNCTPKG</u> ○ <u>MKMFFTVLTVLFLVCSMIIGICEGREIPVKCKGSKQCLQSCKEAGMTYKCMNGKCNCTPKG</u> ○ <u>MKMFFTVLTVLFLVCSMIIGICEGREIPVKCKGSKQCLQSCKEAGMTYKCMNGKCNCTPKG</u> ○ <u>MKVFFAVLITLFLFICSMIIGIH-GVGINVKCKHSGQCLKPKCKDAGMRFGKCNINGKCDCTPKG</u> ● <u>-----VGGINVKCKHSGQCLKPKCKDAGMRFGKCMNGKCDCTPK</u>	78 75 73 97 100	α-KTx 3
pMeKTx14-1 pMeKTx14-2 BmKK3	KF612493 KF612494 Q9BJX2	<u>MKIFFAILLILALICSMIAIWTVNGTAIAVRCSDDADCFGKCPGYPPCKDKFCSCTG</u> <u>MKIFFAILLILALICSMIAIWTVNGTPIAVRCSTNSDCFGKCPGYPTCKNKFCACT-</u> <u>MKIFFAILLILAVCSMAIWTVNGTPEFVRCATDADCSRKCPGNPPCRNGFCACT-</u>	87 76	α-KTx 14
pMeKTx15-1 BmKKx1	KF612511 Q86BX0	<u>MKFSSIIILLTLICLSLIFGNCQVQTNVKCQAGSCASVCRGEIGVAAGKCSINSRVCVYPN</u> <u>MKFSSIIILLTLICLSMIFGNCQVQTNVKCQGGSCASVCRREIGVAAGKCSINGKVCYRN</u>	90	α-KTx 15
pMeKTx16-1 Tx677	KF612517 B8XH38	<u>MKTSIAIVIIAFLICSMILICESQIHTEVPCKYSGQCVQLCIILVNNKNAKSNDTCTCYR</u> <u>MKISALVMITLILICSMMLCQQKILSNRCNNSSECIPHCIRIFGTRAACINNRKCYCYP</u>	46	
pMeKTx17-1 CoTx1	KF612521 O46028	<u>MKSFQIVCYVLILTLMTVIFSDTLVDAVDCNVAQCDKDKCKARGYKKGCHDFNDIGCKCHKWS-</u> <u>MEGIAKITLILFLFVMTMHTFANWNTEAAVCVYRTCDKDKCKRRGYRSGKCINNA---CKCYPYGK</u>	34	
pMeKTx18-1a pMeKTx18-1b pMeKTx18-2 pMeKTx18-3 BmK38	KF612495 KF612496 KF612498 KF612497 Q8MUB1	<u>MQKLFIVLVLFCILQFDGGVDGNVMAFCDRDDCQKTCELVNMNGICVIETEHGLFYHICRCY</u> <u>MQKLFIVLVLFCIFERFDGGVDGNVMAFCDRDDCQKTCELVNMNGICVIETEHGLFYHICRCY</u> <u>MQKLFIVLVLFCILRFNGGVDGNVMAFCDRDDCQKTCELVNMNGICVIETEHDLFYHICRCY</u> <u>MQKLFIVLVLFCILRFDDGGVDGNIMAFCDRDDCQKTCELVDMNGICVIETEHDLFYHICRCY</u> <u>MQKLFIVLVLFCILRLDAEVDGRTATFTQSICEESCKRQKNGRCVIEAESSLIYHLCKCY</u>	97 95 94 56	α-KTx 22
pMeKTx19-1 BmTXKS1	KF612523 Q9SP89	<u>MNRLTTIILILIVINVMIDGIHESKVTAGMGCAMCKIRCVFQGKKVDTCEAPPKCTCKKG</u> <u>MNRLTTIILMLIVINVMIDDISESKVAAGIVCKVCKIICGMQGKVNICKAPIKCKCKKG</u>	73	
pMeKTx20-1a pMeKTx20-1b BmTxKS4	KF612513 KF612514 Q5F1N4	<u>MKLTISFLILVLFSVFFTIEGIIKWFPASVNGKGHSSCSNGLEMTEEDFCKMLCGIDGKLRESKVDHWCYSQILFP</u> <u>MKLTISFLILVLFSVFFTIEGIIKWFPASVNGKGHSSCSNGLEMTEEDFCKMLCGIDGKLRESKVDHWCYSQILFP</u> <u>MKLKISFLILVLFSVFFAIEGIIKWFPASVNGKGHSSCTNGLEMTEEDFCKMLCGIDGKLRESKVDHWCYSQILFP</u>	99 96	
pMeKTx21-1 CoTx1	KF612538 O46028	<u>MK-IVTVILLLAFILCS-QEIA--NVEASGCVFWRCNSDCIRRYGGICQGILNNRYCYCLS---</u> <u>MEGIAKITLILFLFVMTMHTFANWNTEAAVCVYRTCDKDKCKRRGYRSGKC---INNA---CKCYPYGK</u>	40	
pMeKTx22-1 α-KTx J123	KF612518 B5KF99	<u>MNKAYLVAVLVLFLALTINESNEAVPTGGCPPSDLLCAKRCKDMKFGKTGRCTGPNKTVCKCSI</u> <u>MNKVYLVAVLVLFLALTINESNEAVPTGGCPPSDFCAKRCKDMKFGNTGRCTGPNKTVCKCSI</u>	94	
pMeKTx23-1 pMeKTx23-2 TXKs2	KF612484 KF612485 Q9SP88	<u>MTYAILIIVSLLLISDGISNVVDKYCSEDPLDCNEHC-KTKNQIGVCHGANGKEKCSCMDS</u> <u>MTYAILIIVSLLLISDGISNVVDKYCSEDPLDCNEHC-KTKNQIGVCHGANGKEKCSCMDS</u> <u>MTYAILIIVSLLLISDRISNVVDKYCSENPLDCNEHCLKTKNQIGCHGANGNEKCSCMES</u>	98 90	
pMeKTx24-1	KF612519	<u>MNNYYKIVLIMVAFFAVTITTFSNIQVEAQCNKIGCYAYCWRKRLIGHCVTKENCKFNQNK</u>		
pMeKTx25-1	KF612486	<u>MNNYYKILLIMAAFFVTITTFPNIQVEAACRSRSCTRICTRKLKVGICNGDECKCFEASKYQF</u>		
pMeKTx26-1 pMeKTx26-2 BmP05	KF612488 KF612487 Q9TVX3	<u>MNNYFKIVLIMAAFFVVTITTFSNMQVE-AGCDRKNCFWECRRKHNKLQNCNSGKCECIV-GKLR--PGGRMAEW</u> <u>MNNYFKIVLIMAAFFVVTITTFSNIQVE-AGCDWKCQKECTGK--KVVGMCMDGECTCVS-GQPRQKPGRRMAEW</u> <u>MHNYKIVLIMVAFFAVTITTFSNIQVEGAVCNLKRCQLSCRSLG--LLGKCIGDKCECVKHGK-----</u>	70 54	
pMeKTx27-1 α-KTx Tx308	KF612522 B8XH30	<u>MQKLFIVLVLFCILRFDDVEVDGRTMSLCNMSDCQERCKKQKNSGRCVTEFEMNYVYHFCRCY</u> <u>MQKLFIVLVLFCILRLDAEVDGRTMSHCNQSECQEKCKKKNNGRCTEFEMNYVYNRCRCN</u>		

Название	ID	Сравнение аминокислотных последовательностей	Идентичность, %	Семейство КТх
pMeKTx28-1	KF612530	<u>MMKQQFFLFLAVIVMISSVIEAGRGREFMSNLKEKLSGVKEKMKNSWNR</u> LTSMSEYACFVIEKWCEDHCQAKNAIGKCENTECKCLNMSK	89	β-КТх 2
pMeKTx28-2	KF612529	<u>MMKQQFFLFLAVIVMISSVIEAGRGREFMSNLKEKLSGVKEKIKHSWN</u> KLTSMSSEYACFVIEKWCEDHCEAKKAIGKCENTECKCLKLSK	88	
pMeKTx28-3	KF612531	<u>MMKQQFFLFLAVIVMISSVIEAGRGREFMSNLKEKLSGVKEKIKHSWN</u> KLTSMSSEYACFVIEKWCEDHCEAKNAIGKCENTECKCLKLSK	88	
MeuTXKβ3	POCH57	▲ <u>MMKQQFFLFLAVIVMISSVIEAGRGREFMSNLKEKLSGVKEKMKNSWNR</u> LTSMSEYACFVIEKWCEDHCQAKNAIGRCENTECKCL--SK	98	
pMeKTx29-1	KF612532	<u>MQRNLVLLFLGMVALSSCGLREKHFQRLVKYAVPESTLRTILQTA</u> VHKVGTQFGCPAYQGYCDDHCQDIENKEGFGCHGFKCKCGIPMGF	99	β-КТх 1
pMeKTx29-2	KF612533	<u>MQRNLVLLFLGMVALSSCGLREKHFQRLVKYAVPESTLRTILQTA</u> VHKVGTQFGCPAYQGYCDDHCQDIENKEGFGCHGFKCKCGIPMGF	99	
MeuTXKβ1	A9XE60	▲ <u>MQRNLVLLFLGMVALSSCGLREKHFQRLVKYAVPESTLRTVLQTV</u> VHKVGTQFGCPAYQGYCDDHCQDIEKKEGFGCHGFKCKCGIPMGF	95	
pMeKTx30-1	KF612540	<u>MNRF-FILLLL</u> VVIVSHAKAEDEGYRGS CPS LGKPCNSNRDCCPYGEHCLSAGKGYFCQDPGP	94	λ-КТх
pMeKTx30-2	KF612541	<u>MNRF-FILLLL</u> VVIVSHAKAVDEGYRGS CPS LGKPCNSNRDCCPYGEHCLSAGEGYFCPPDGP	94	
pMeKTx30-3	KF612542	<u>MNRF-FILLLL</u> VVIVSHAKAEKGYRGS CPS LGKPCNSNKDCCPYGERCLSAGEGYFCQDPGP	91	
λ-MeuTx-1	P86399	▲ <u>MSTFIVV</u> VELLLTAILCHA EHAIDE TARGCNRLLNKKCNSDADCCRYGERCISTGVNYYCRPDPGP	41	

Таблица 12. Предполагаемые предшественники КТх из транскриптома *O. scrobiculosus*. Последовательности были разделены на 7 групп согласно сходству аминокислотных последовательностей. Наиболее идентичные последовательности КТх из этого и других видов скорпионов включены в каждую группу для сравнения. Предсказанные сигнальные пептиды обозначены подчеркиванием. Пунктирные линии обозначают альтернативный вариант процессинга сигнальных пептидов. Различающиеся аминокислотные остатки обозначены серым цветом. ○ – зрелый пептид был идентифицирован впервые в этой работе, ● – ранее и в этой работе.

Название	ID	Сравнение аминокислотных последовательностей	Идентичность, %	Семейство КТх
pOsKTx1-1	POC908	● <u>MKVFFAILITL</u> FVCSMIIGSHGGVIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	81	α-КТх 3
BoiTx1		<u>MKVFFAVLIAL</u> FVCSMIGIHGGVPIINVKCRGSRDCLDPCKKAGMRFGKINSKCHCTP		
pOsKTx2-1	Q9NJP7	<u>MSRLF</u> TLVIVLAMNAMMAIIISDPGVEAVGCEVCPMHCKGKNALPTCDDGVNCNV	98	α-КТх 9
pOsKTx2-2		<u>MSRLF</u> TLVIVLAMNAMMAIIISDPGVEAVGCEECPMHCKGKNALPTCDDGVNCNV	98	
BmP02		<u>MSRLF</u> TLVIVLAMNVMMAIIISDPVVEAVGCEECPMHCKGKNALPTCDDGVNCNV	93	
pOsKTx3-1	Q9U8D2	○ <u>MCRLYAII</u> LIVLVMNVIMTIIIPDSKVEVVSCEDCPEHCSTQKARAKCNDKCVCEPI	80	α-КТх 8
BmP01		<u>MCRLYAII</u> LIALVFNVMVTIITPDMKVEAATCEDCPEHCATQKARAKCNDKCVCEPK		
pOsKTx4-1	B8XH44	<u>MKFLFL</u> TLLVCCFIAVLVIPNEAQIDINVPCKHGPEECAEPCCKRLKCLLPSKCGNGKCS CYPSIKIPNCKV---	85	α-КТх 27
BoiTx771		<u>MKFLFL</u> TLEVCCFIAVLVIPSEAQIDINVSCRYGSD-CAEPCCKRLKCLLPSKCTINGKCTCYPSIKIKNCKVQTY		
pOsKTx5-1	Q95P88	<u>MMTYVFL</u> IVVSLLLISVGITNAVDKYCSKNPLDCNEHCLKTKNETGFGCHGPKGKEKCS CMKT	97	
pOsKTx5-2		<u>MMTYVFL</u> IVVSLLLISVGITNAVDKYCSKNPLDCNEYCLKTKNETGFGCHGPKGNEKCS CMKT	97	
TXKs2		<u>-MTYAILI</u> IVSLLISDRISNVVDKYCSENPLDCNEHCLKTKNQITGICHGANGNEKCS CMES	74	
pOsKTx6-1	Q95NJ8	<u>MKFII</u> VLILISVLMITTVPVSEAGGYGSCQNLQDCQRYCSTPDRCSYGT CYCKTTGK	75	α-КТх 17
BmKK4		<u>MKFII</u> VLILISVLIATIVPVNEA--QTQCQSVRDCQYCLTPDRCSYGT CYCKTTGK		
pOsKTx7-1	A9XE60	<u>MQRNLVLLFLGMVALSSCGLREKHFQRLVKYAVPESTLRTILQTA</u> VHKVGTQFGCPAYQGYCDDHCQDIENKEGFGCHGFKCKCGIPMGF	91	β-КТх 1
MeuTXKβ1		<u>MQRNLVLLFLGMVALSSCGLREKHFQRLVKYAVPESTLRTVLQTV</u> VHKVGTQFGCPAYQGYCDDHCQDIEKKEGFGCHGFKCKCGIPMGF		

6.4 Выделение и характеристика блокаторов K^+ каналов из цельных ядов скорпионов

6.4.1 Выделение новых КТх из яда *M. eurus* с помощью хроматографических методов

Цельный яд *M. eurus* был разделен с помощью эксклюзионной хроматографии с последующей двухстадийной ОФ-ВЭЖХ. Для идентификации токсинов, активных на K_v , была использована система скрининга на основе сферопластов, экспрессирующих гибридные $KcsA-K_v1.1$. На первом этапе цельный яд был разделен на три грубые фракции с помощью эксклюзионной хроматографии (I–III, **Рисунок 33 А**). Эти фракции были протестированы на способность связываться с гибридными $KcsA-K_v1.1$, и активность была обнаружена только во фракции II (**Рисунок 33 В**). Отрицательный результат, полученный при тестировании фракций I и III, говорит о том, что они не содержат высокоаффинных лигандов $K_v1.1$.

Для выделения активных компонентов фракция II была подвержена разделению с помощью ОФ-ВЭЖХ (**Рисунок 33 Б**). В результате было получено 40 отдельных субфракций, которые также были протестированы на $KcsA-K_v1.1$ (**Рисунок 33 Г**). Шесть субфракций (А–F) вытесняли R-AgTx2 из комплексов с гибридными каналами, следовательно содержали потенциальные активные компоненты. Небольшой эффект наблюдался в некоторых соседних фракциях из-за присутствия примеси активных компонентов. Субфракции 28 и 29 продемонстрировали слабый и непостоянный эффект, а также степень вытеснения R-AgTx2 из комплексов с каналами при повышении концентрации.

Второй раунд ОФ-ВЭЖХ позволил выделить активные компоненты в индивидуальном виде. Для этого использовался 90-мин линейный градиент раствора V_3 . Каждая из субфракций А, D, E и F содержала единственный активный компонент. В субфракции С (**Рисунок 33 Е, Ж**) было идентифицировано два активных вещества (С1 и С2). Субфракция В также содержала два активных компонента (В1 и В2), которые не удалось разделить даже в результате второго раунда ОФ-ВЭЖХ. Для успешного разделения этих компонентов были подобраны другие условия: в качестве элюирующего был использован раствор V_4 (**Рисунок 33 Д, Ж**). В результате восемь блокаторов $K_v1.1$ были обнаружены и выделены из яда *M. eurus*. Гомологичность активных компонентов А, В1, В2, С1, С2, D, E и F была подтверждена масс-спектрометрически.

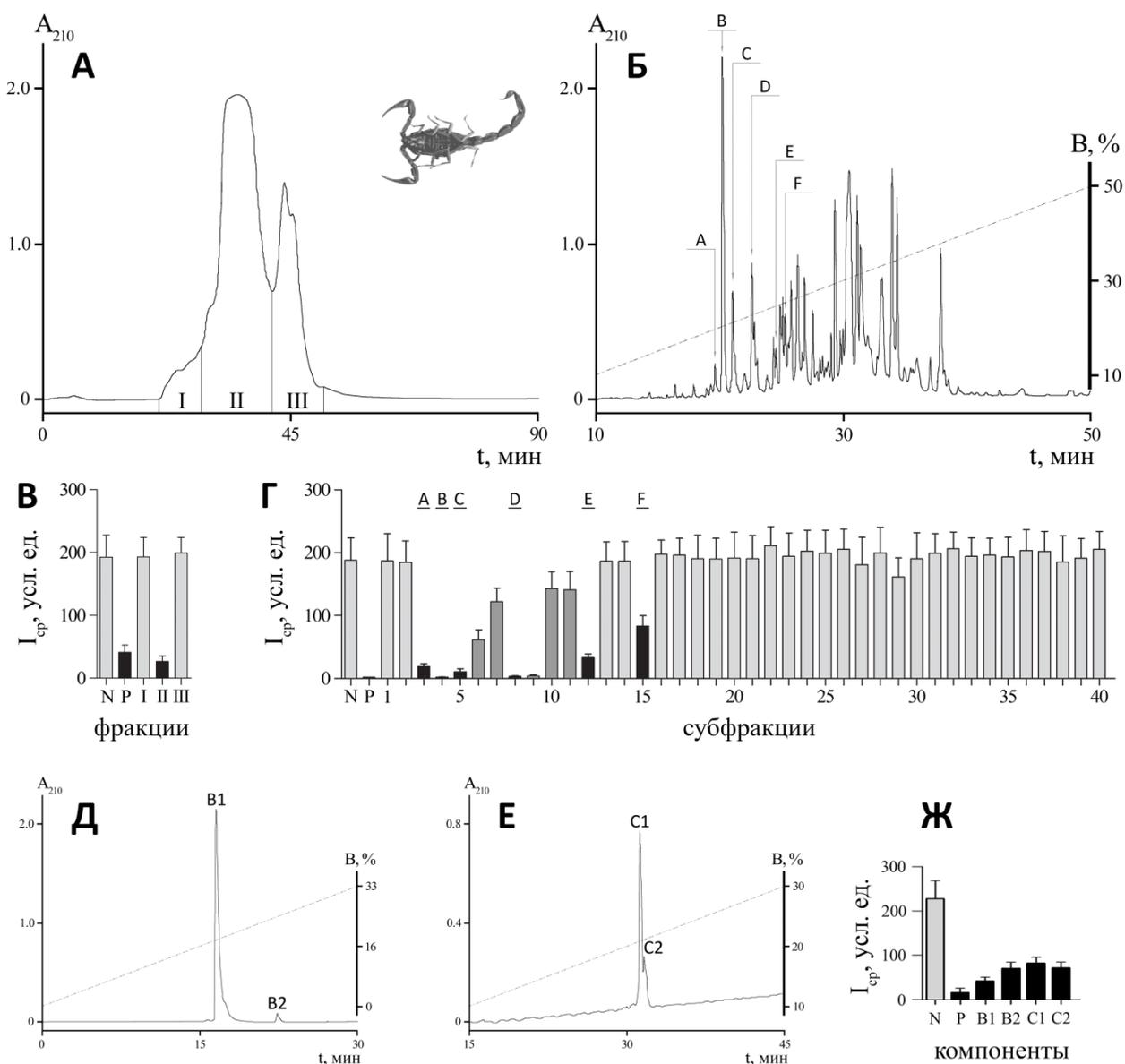


Рисунок 33. Разделение яда *M. eurus* и анализ с помощью системы скрининга на основе сферопластов. А – разделение 7 мг цельного яда на три фракции с помощью эксклюзионной хроматографии на колонке TSK 2000SW. Фракции обозначены римскими цифрами. Б – разделение фракции II на субфракции с помощью ОФ-ВЭЖХ в линейном градиенте концентрации ацетонитрила. Активные субфракции обозначены латинскими буквами. В, Г и Ж – интенсивность флуоресценции комплексов KcsA-K_v1.1 с R-AgTx2 на поверхности сферопластов. Чистый раствор F₂ (N, отрицательный контроль), AgTx2 (10 нМ; P, положительный контроль) или фракции/субфракции/компоненты яда были добавлены к сферопластам. Черные столбики обозначают активные фракции/субфракции/компоненты, темно-серые столбики – субфракции, которые содержали примесь активных компонентов из соседних субфракций, а светло-серые столбики – неактивные фракции/субфракции/компоненты. Д и Е – дополнительные раунды ОФ-ВЭЖХ для субфракций В и С, содержащих несколько активных компонентов (В1 и В2, а также С1 и С2).

6.4.2 Анализ хроматографического профиля яда *M. eurus* и секвенирование активных компонентов

Ранее в яде скорпиона *M. eurus* были найдены следующие токсины: три α-КТх (MeuКТх-1, P86400; MeuКТх-3, P86396; и MeuТх3В, D3JXM1) (196, 394, 395), один β-КТх

(MeuTXKβ1, A9XE60) (303), один γ-КТх (BeKm-1, Q9VKV7) (396) и один λ-КТх (λ-MeuTx-1, P86399) (314). Поскольку β-КТх и λ-КТх – очень слабые ингибиторы K_v, а γ-КТх – блокаторы определенного типа K_v (K_v11 или ERG), данное исследование было сфокусировано на α-КТх – семействе наиболее представленных и высокоаффинных лигандов K_v. Всего пять новых и три уже описанных пептида было идентифицировано в яде *M. eureus* с помощью комбинации методов ОФ-ВЭЖХ, масс-спектрометрии и флуоресцентного подхода (Таблица 13). Три известные α-КТх (MeuКТх-1, MeuКТх-3 и MeuTx3В) были обнаружены в субфракциях В, С и F (соответствуют компонентам В1, С2 и F). Соответствие было подтверждено с помощью частичной N-концевой ступенчатой деградации по Эдману, масс-спектрометрии и сравнения времени элюции при ОФ-ВЭЖХ с опубликованными данными.

Помимо известных токсинов, два дополнительных активных компонента были обнаружены в субфракциях В и С. Компонент В2 (MeКТх1-2) – очень близкий гомолог MeuКТх-1 с двумя аминокислотными заменами (E8P и D20E), а компонент С1 (MeКТх13-3) имеет идентичную аминокислотную последовательность с токсином, выделенным из родственного вида скорпиона *Mesobuthus martensii* (ВmКТХ, Q9NII7) (397). Разница в один аминокислотный остаток между MeКТх13-3 и MeuКТх-3 была идентифицирована в позиции 28 (I28M). Аминокислотные последовательности новых пептидов были установлены методом деградации по Эдману на автоматическом секвенаторе и названы, как показано в Таблице 13; все КТх были зарегистрированы в базе данных UniProt.

Таблица 13. Токсины, действующие на K_v, которые были выделены из яда *M. eureus*. ○ – компоненты были идентифицированы впервые в этой работе, ● – ранее и в этой работе. Z – остаток пироглутаминовой кислоты. –NH₂ – амидирование.

Фракция	Название	ID	Аминокислотная последовательность	Мм	
A	1○	MeКТх13-2	C0HJQ4	REIPVKCKGSKQCLQSCKEAGMTYGKCMNGKCNCTPK-NH ₂	4047
B	1●	MeuКТх-1	P86400	VSCEDCPEHCATKDKQRAKCDNDKCVCEPK	3250
	2○	MeКТх1-2	C0HJQ5	VSCEDCPPHCATKDKQRAKCE N DKCVCEPK	3232
C	1○	MeКТх13-3	C0HJQ6	VGINVKCKHSGQCLKPKCKDAGMRFGKCI N GKCDCTPK-NH ₂	3962
	2●	MeuКТх-3	P86396	VGINVKCKHSGQCLKPKCKDAGMRFGKCM N GKCDCTPK-NH ₂	3980
D	1○	MeКТх11-3	C0HJQ7	ZFTDVKCTVTKQ C WVPVCKKMFGRPNGKCMNGKCR C YS	4255
E	1○	MeКТх11-1	C0HJQ8	ZFTDVKCTGTKQ C WVPVCKKMFGRPNGKCMNGKCR C YP	4222
F	1●	MeuTx3В	F5CJW1	FGLIDVKCSASREC C WVAC K KKVTGSGQ G CKQ N NCRCY	4066

Токсины MeКТх11-3 и MeКТх11-1 (компоненты D и E) оказались N-блокированными N-концевым остатком пироглутаминовой кислоты (<Glu или Z), который образуются из N-концевого остатками глутамин (Gln), поэтому не подвергались

деградации по Эдману. Блокировка была снята отщеплением остатка пироглутаминовой кислоты с помощью фермента пироглутаматаминопептидазы, после чего полные аминокислотные последовательности были установлены на автоматическом секвенаторе. Эти токсины оказались близкими гомологами, отличающимися двумя аминокислотными заменами (V9G и S37P).

Для токсинов MeКТх13-2, MeКТх13-3 и MeuКТх-3 из субфракций А и С было показано наличие С-концевого амидирования. Эта посттрансляционная модификация была идентифицирована в результате сравнения молекулярных масс (разница в 1 Да), полученных экспериментально, с рассчитанными значениями на основании аминокислотных последовательностей.

6.4.3 Выделение КТх из яда *O. scrobiculosus* с помощью хроматографических методов

Цельный яд *O. scrobiculosus* так же был разделен с помощью эксклюзионной хроматографии с последующей двухстадийной ОФ-ВЭЖХ. Для идентификации токсинов, активных на K_v , была использована система скрининга на основе сферопластов, на этот раз экспрессирующих гибридные KcsA- K_v 1.3. На первом этапе с помощью эксклюзионной хроматографии цельный яд был разделен на четыре отдельные фракции (I–IV, **Рисунок 34 А**). Фракции III и IV вытесняли R-AgТх2 из комплексов с KcsA- K_v 1.3, поэтому потенциально могли содержать активные молекулы (**Рисунок 34 Г**). Фракции III и IV были разделены с использованием ОФ-ВЭЖХ на 43 и 19 субфракций, соответственно (**Рисунок 34 Б, В**). Субфракции III-6 и IV-6 (отмеченные звездочкой на **Рисунке 34 Б, В**) конкурировали за сайт связывания с R-AgТх2 (**Рисунок 34 Д, Е**). Во фракциях III-11, III-12, III-15 и III-16 возможно присутствовали низкоаффинные лиганды K_v 1.3, так как наблюдалось частичное, но достоверное и воспроизводимое вытеснение R-AgТх2 (**Рисунок 34 Б**). В субфракциях III-5 и III-7 небольшая активность обуславливалась примесью компонента из III-6. Гомогенность активных компонентов в субфракциях III-6 и IV-6 была подтверждена ОФ-ВЭЖХ и МАЛДИ масс-спектрометрией (**Рисунок 34 Ж, З**).

Основываясь на транскриптомных данных было предположено, что в яде *O. scrobiculosus* присутствует еще один КТх, активный на K_v , который не удалось идентифицировать с помощью флуоресцентной системы. Чтобы обнаружить потенциальный токсин, цельный яд был разделен непосредственно с помощью ОФ-ВЭЖХ на колонке Jupiter C₅.

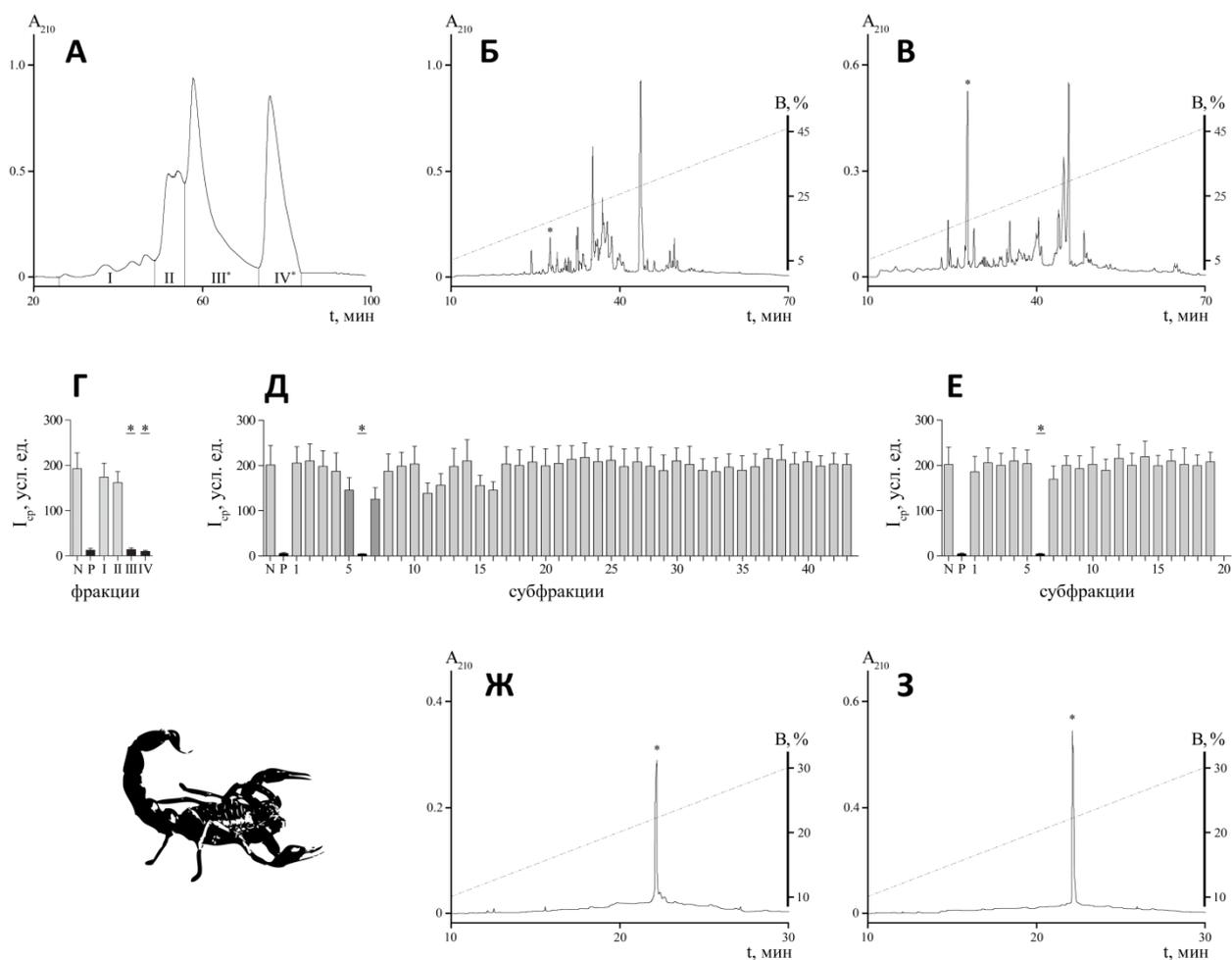


Рисунок 34. Разделение яда *O. scrobiculosus* и анализ с помощью системы скрининга на основе сферопластов. А – Разделение 5 мг цельного яда на четыре фракции с помощью эксклюзионной хроматографии на колонке TSK 2000SW. Б, В – Разделение фракций III и IV на субфракции с использованием ОФ-ВЭЖХ на колонке Vydac C₁₈ в линейном градиенте концентрации ацетонитрила. Г, Д и Е – интенсивность флуоресценции комплексов KcsA-K_v1.3 с R-AgTx2 на поверхности сферопластов. Чистый раствор F₂ (N, отрицательный контроль), AgTx2 (10 нМ; P, положительный контроль) или фракции/субфракции яда были добавлены к сферопластам. Черные столбики обозначают активные фракции/субфракции, темно-серые столбики – субфракции, которые содержали примесь активного компонента из соседней субфракции, светло-серые столбики – неактивные фракции/субфракции. Д и Е – дополнительные раунды ОФ-ВЭЖХ для субфракций III-6 и IV-6, содержащих активные компоненты. Активные фракции/субфракции везде обозначены звездочками.

Полученные фракции анализировались с использованием МАЛДИ масс-спектрометрии и сравнивались с транскриптомными данными. Искомый токсин, имеющий расчетную молекулярную массу 3206,6 Да, был найден во фракции Os-9 от деления цельного яда. Второй раунд ОФ-ВЭЖХ – на колонке Vydac C₁₈ – позволил выделить новый пептид (Os-9-2) в индивидуальном виде (**Рисунок 35**).

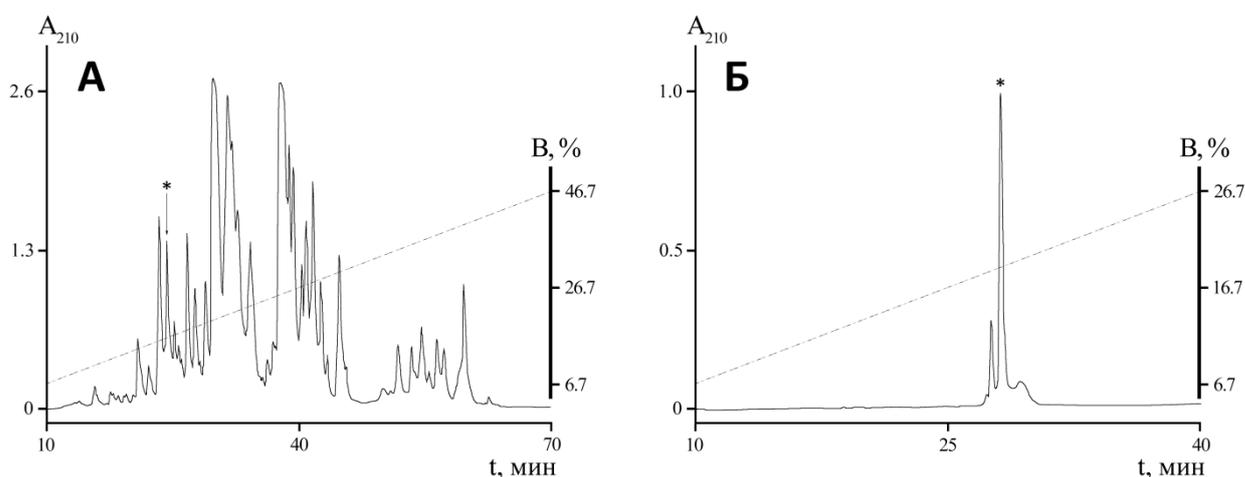


Рисунок 35. Выделение нового пептида (Os-9-2 или OSK3) из яда *O. scrobiculosus* с помощью двухстадийной ОФ-ВЭЖХ. А – разделение 1,5 мг цельного яда *O. scrobiculosus* на колонке Jupiter C₅. Фракция с искомой молекулярной массой (Os-9) обозначена звездочкой. Б – выделение искомого компонента в индивидуальном виде (обозначен звездочкой) на колонке Vydac C₁₈.

6.4.4 Анализ хроматографических профилей яда *O. scrobiculosus* и идентификация КТх

Активные компоненты в субфракциях III-6 и IV-6 имели идентичную молекулярную массу (4205,2 Да), а также одинаковое время элюции при ОФ-ВЭЖХ. Кроме того, частичное *N*-концевое секвенирование подтвердило, что оба компонента являются одним и тем же пептидом. Вероятно, этот пептид элюировался на границе фракций III и IV во время разделения яда эксклюзионной хроматографией, в результате чего попал в обе эти фракции. Частичная *N*-концевая аминокислотная последовательность, молекулярная масса и наличие шести остатков цистеина (разница молекулярных масс нативного и восстановленного-алкилированного винилпиридином пептида составила 637 Да) позволила однозначно утверждать, что данный пептид – описанный ранее токсин OSK1 (398) (Таблица 14).

Таблица 14. КТх, выделенные из яда *O. scrobiculosus*. ○ – компонент был идентифицирован впервые в этой работе, ● – ранее и в этой работе.

Фракция	Название	ID	Аминокислотная последовательность	Мм	
III	6●	OSK1	P55896	GVIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	4205
IV	6●	OSK1	P55896	GVIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	4205
Os-9	2○	OSK3	C0HK17	VSCEDCPEHCSTQKARAKCDNDKCVCEPI	3207

Аминокислотная последовательность пептида, который был выделен, опираясь на транскриптомные данные, была подтверждена полной *N*-концевой ступенчатой деградацией по Эдману. Число аминокислотных остатков составило 29, шесть из

которых – остатки цистеина. Поскольку из яда *O. scrobiculosus* ранее было выделено два КТх: OSK1 (P55896) (398) и OSK2 (P83244) (317), новый компонент получил название OSK3 (Таблица 14).

6.4.5 Физиологическая характеристика новых токсинов

Для фармакологической характеристики новых токсинов были проведены электрофизиологические исследования на нескольких изоформах K_v , используя метод двухэлектродной фиксации потенциала. На **Рисунке 36** показаны кривые записи токов через соответствующий канал до и после добавления токсинов MeKTx13-2, MeKTx1-2, MeKTx13-3, MeKTx11-3, MeKTx11-1 и OSK3. В концентрации 1 мкМ все токсины частично или полностью ингибировали следующие каналы: $K_v1.2$, $K_v1.3$ и $K_v1.6$. Кроме того, токсины из *M. eureus* (MeKTx13-2, MeKTx1-2, MeKTx13-3, MeKTx11-3 и MeKTx11-1) показали активность на $K_v1.1$. Ингибирование $K_v1.4$ и $K_v1.5$ не наблюдалось ни одним из токсинов. Для всех КТх были построены кривые «доза-ответ» (**Рисунок 37**) и рассчитаны значения IC_{50} по отношению к каналам, на которых наблюдался эффект (**Таблица 15**).

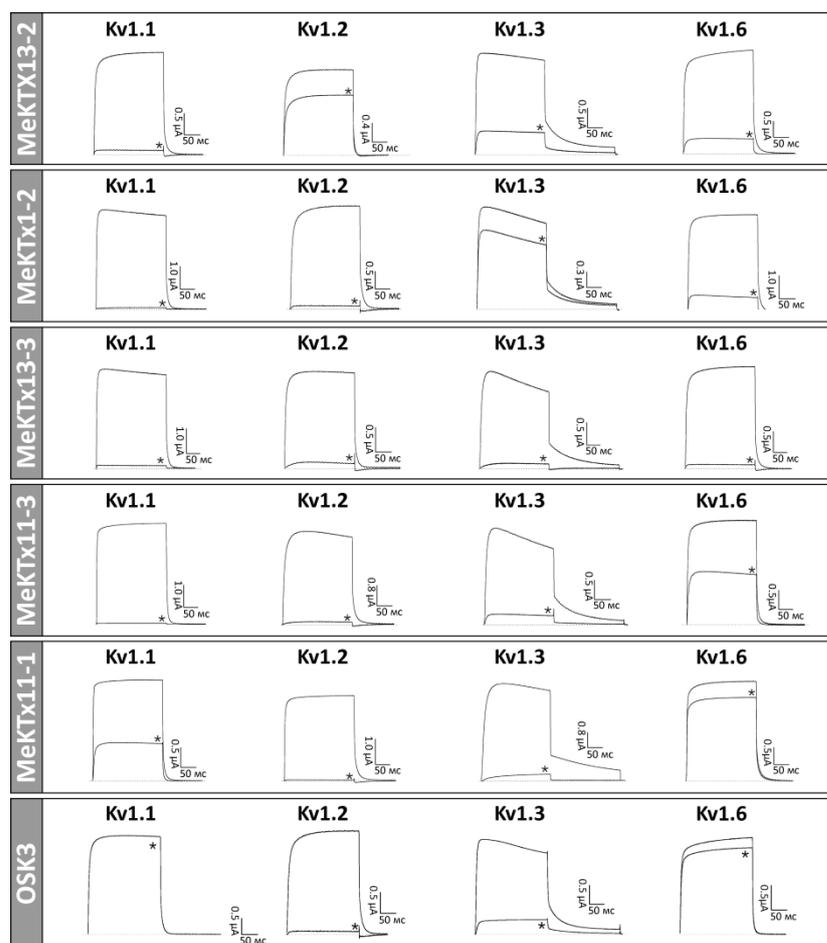


Рисунок 36. Кривые записи тока через K_v каналы в контрольных образцах и после добавления соответствующего блокатора.

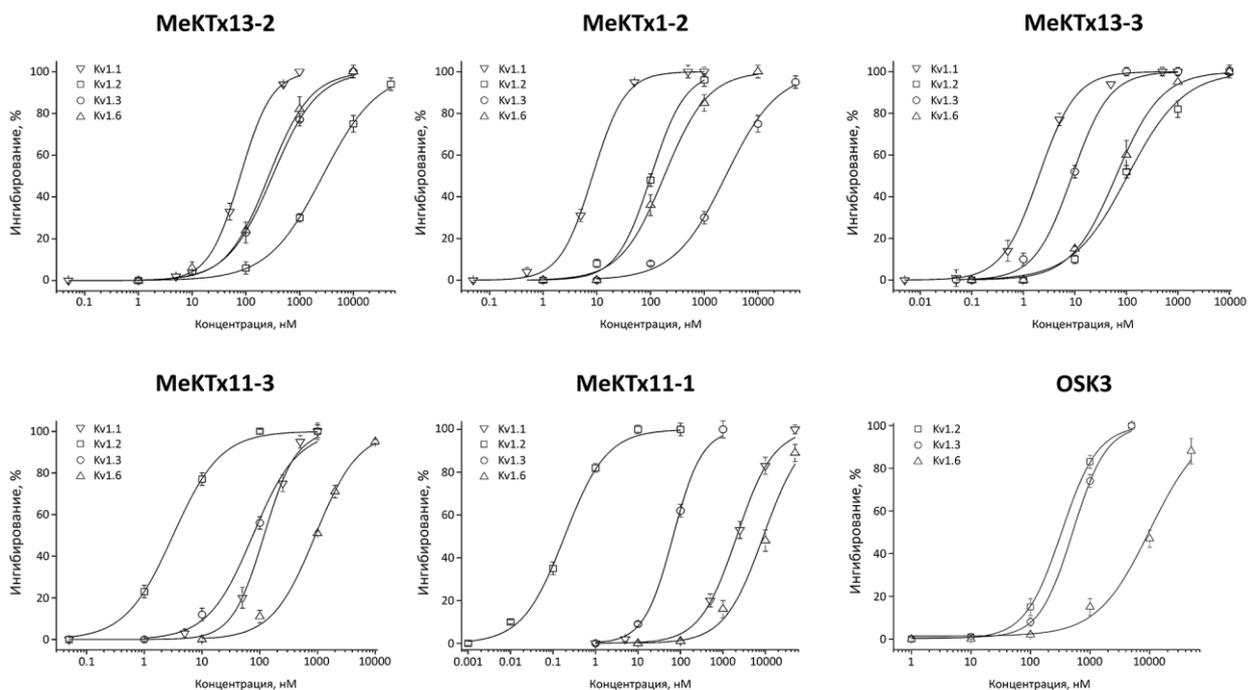


Рисунок 37. Кривые «доза-ответ» для токсинов MeKTx13-2, MeKTx1-2, MeKTx13-3, MeKTx11-3, MeKTx11-1 и OSK3, полученные на $K_v1.1-1.3$ и $K_v1.6$.

Таблица 15. Значения IC_{50} для новых токсинов, выделенных из *M. eupyus* и *O. scrobiculosus*. OSK3 не показал эффекта на $K_v1.1$ вплоть до концентрации 1 мкМ.

Токсин	$K_v1.1$ (IC_{50} , нМ)	$K_v1.2$ (IC_{50} , нМ)	$K_v1.3$ (IC_{50} , нМ)	$K_v1.6$ (IC_{50} , нМ)
<i>M. eupyus</i>				
MeKTx13-2	90,3 ± 2,2	2677,7 ± 101,2	311,7 ± 19,7	266,3 ± 23,0
MeKTx1-2	8,5 ± 1,2	102,2 ± 12,1	2525,3 ± 422,0	180,0 ± 18,1
MeKTx13-3	1,9 ± 0,2	105,9 ± 14,6	8,9 ± 0,9	63,4 ± 4,5
MeKTx11-3	134,8 ± 10,1	3,1 ± 0,2	78,5 ± 11,2	911,0 ± 107,3
MeKTx11-1	2110,4 ± 146,2	0,19 ± 0,01	67,0 ± 5,1	8922,6 ± 856,7
<i>O. scrobiculosus</i>				
OSK3	–	330,9 ± 16,9	503,1 ± 30,8	9983,4 ± 171,5

6.4.6 Классификация новых КТх, выделенных из яда *M. eupyus* и *O. scrobiculosus*

Анализ аминокислотных последовательностей токсинов, выделенных из яда *M. eupyus* и *O. scrobiculosus*, позволил однозначно отнести их к семейству α -КТх гомологии (Рисунок 38). Токсины MeKTx11-1 и MeKTx11-3 принадлежат подсемейству

α -КТх 1, куда входят такие известные представители, как ChTx и IbTx. Два ранее описанных токсина OSK1 и MeuKTx-3, а также новые полипептидные блокаторы

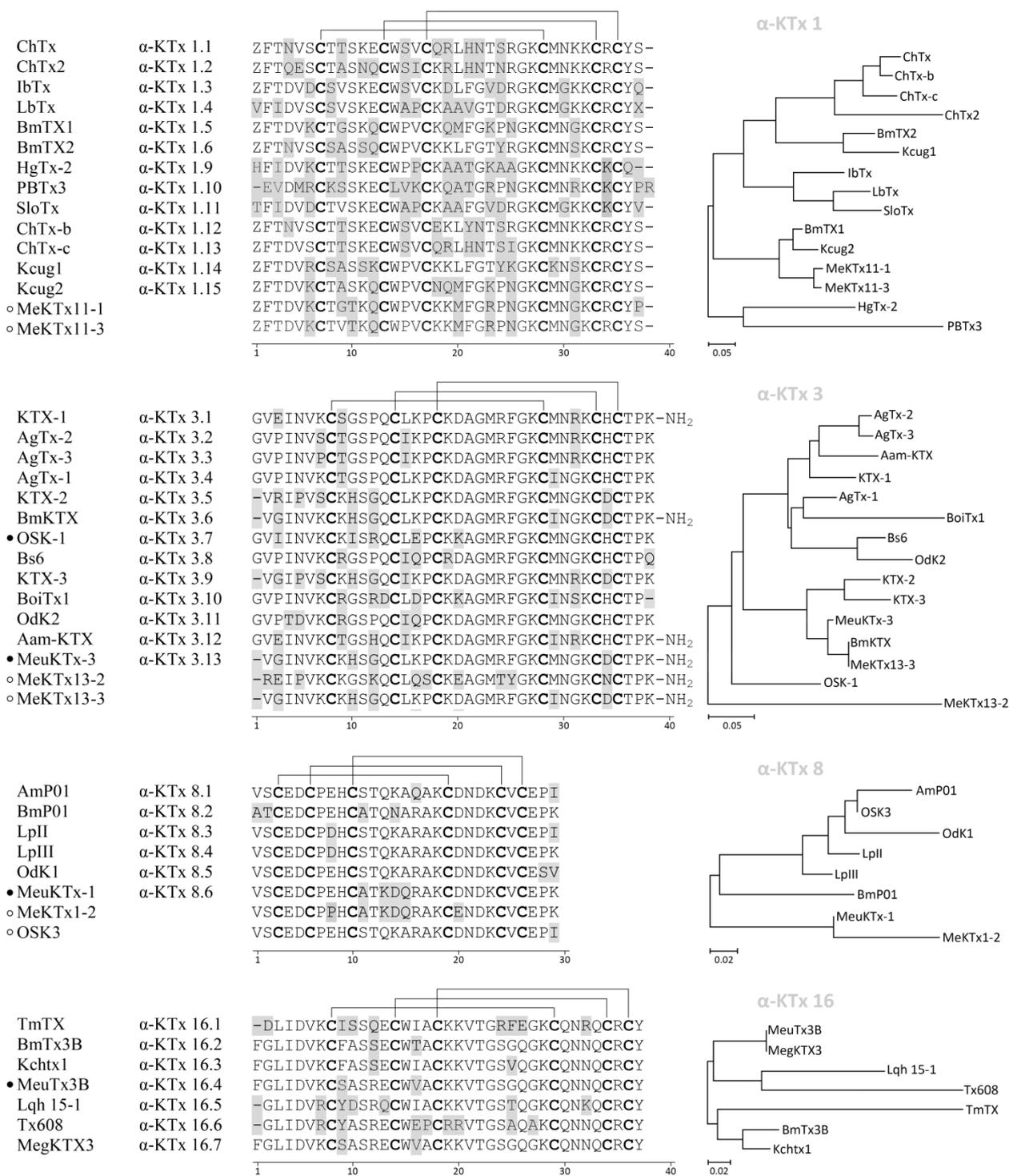


Рисунок 38. Сравнение аминокислотных последовательностей токсинов, выделенных из *M. eureus* и *O. scrobiculosus*, с КТх из других скорпионов. Полипептиды объединены в подсемейства согласно сходству аминокислотных последовательностей. Отличающиеся аминокислотные остатки обозначены серым цветом, остатки цистеина выделены полужирным шрифтом. Z – остаток пироглутаминовой кислоты. Линиями обозначено предполагаемое расположение дисульфидных связей. o – компонент был идентифицирован впервые в этой работе, • – ранее и в этой работе. Филогенетические деревья для каждого подсемейства токсинов, построенные по алгоритму «ближайшего соседа», представлены справа.

MeКТх13-2 и MeКТх13-3 относятся к подсемейству α -КТх 3. MeКТх1-2 и OSK3, а также ранее описанный MeuКТх-1 принадлежат к подсемейству коротких α -КТх – α -КТх 8. И наконец, ранее известный токсин MeuТх3В является представителем подсемейства α -КТх 16.

Новые КТх были добавлены в базу данных Kallium (см. выше) и получили следующие систематические названия: MeКТх11-1 – α -КТх 1.16, MeКТх11-3 – α -КТх 1.17, MeКТх13-2 – α -КТх 3.18, MeКТх13-3 – α -КТх 3.19, MeКТх1-2 – α -КТх 8.7, OSK3 – α -КТх 8.8.

6.5 Создание нового биомолекулярного инструмента на основе КТх для визуализации K^+ каналов

В соответствии с современной тенденцией использования токсинов для изучения ионных каналов, были разработаны новые биомолекулярные инструменты на основе химер флуоресцентных белков с КТх. Работа по получению химерного белка включала следующие этапы:

- 1) подбор флуоресцентного и лигандного модулей, а также линкера, соединяющего их;
- 2) анализ модели пространственной структуры комплекса токсина с K^+ каналом;
- 3) создание вектора, несущего в своем составе последовательность, кодирующую целевой белок;
- 4) трансформация культуры *Escherichia coli* полученным вектором;
- 5) контролируемая экспрессия гибридного белка в клетках *E. coli*;
- 6) выделение гибридного белка, его последующая очистка и концентрирование целевого продукта;

Этот молекулярный инструмент был использован в различных областях: а) для поиска новых лигандов K^+ каналов, б) для визуализации ионных каналов на срезах мозжечка и в) для детекции изменения профиля экспрессии K_v во время заболевания.

6.5.1 Дизайн химерного флуоресцентного белка eGFP-OSK1

Из широкого разнообразия известных в настоящее время флуоресцентных белков был выбран наиболее подходящий для выполнения поставленной задачи. Критериями выбора служили: доступность генетического материала (вектора), кодирующего флуоресцентный белок, высокий квантовый выход флуоресценции, наличие приборной базы, необходимой для детекции сигнала флуоресценции, существование

флуоресцентного белка в мономерном состоянии. Всем этим критериям соответствовал так называемый «усиленный» зеленый флуоресцентный белок (eGFP – enhanced green fluorescent protein), который и был выбран для дальнейшей работы.

В качестве лигандного модуля было предложено использовать блокатор калиевых каналов OSK1 из яда скорпиона *O. scrobiculosus* по следующим причинам: во-первых, токсин действует на несколько изоформ K_v каналов ($K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v1.3$ и $K_v1.6$) в наномолярных концентрациях, а также активен по отношению к $K_{Ca3.1}$; во-вторых, OSK1 был впервые выделен и всесторонне охарактеризован в лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов, и ранее был получен вектор, содержащий в своем составе последовательность, кодирующую OSK1; в-третьих, для данного блокатора K^+ каналов известна пространственная структура.

Для соединения флуоресцентного и лигандного модулей было предложено использовать глицин-сериновый $(G_4S)_3$, поскольку он обладает высокой гибкостью, не заряжен, мало реакционноспособен и хорошо растворим в воде. Кроме того, длина линкера оптимальна для пространственного разделения модулей, что позволяет им не «мешать» друг другу выполнять свои функции: флуоресцентному белку давать сигнал и исключить неспецифическое взаимодействие с каналами за счет сближения в пространстве, а OSK1 беспрепятственно связываться с поровым участком K^+ канала (Рисунок 39 А).

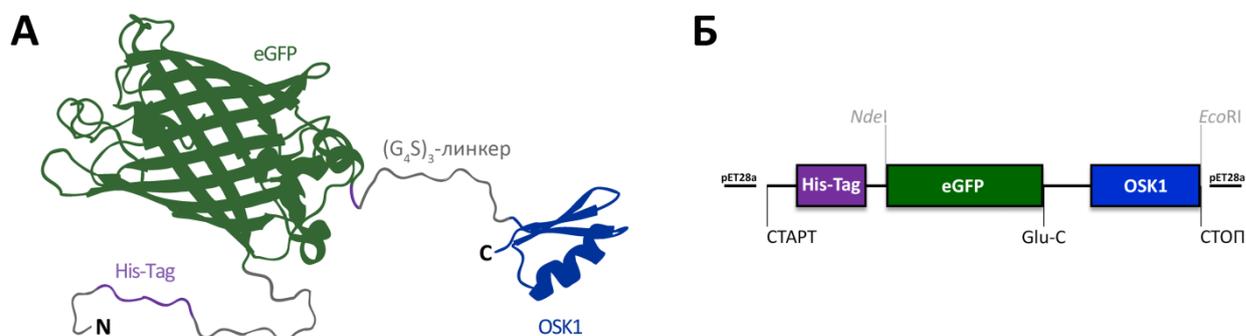


Рисунок 39. А – схема организации химеры eGFP-OSK1. Функциональные элементы обозначены и выделены разными цветами. Б – структура гена химерной молекулы eGFP-OSK1. Участки, кодирующие гексагистидиновую метку (His-Tag), флуоресцентный белок (eGFP) и токсин (OSK1) обозначены разными цветами. Также обозначены стартовый и стоп-кодоны, рестрикционные сайты и последовательность, кодирующая сайт гидролиза эндопротеиназой Glu-C.

OSK1 формирует в пространстве укладку типа $CS\alpha/\beta$ (399), характерную для большинства блокаторов K^+ каналов из яда скорпионов (см. раздел 3.2.2.6.1), в том числе для ChTx. С помощью трехмерного выравнивания (программа PyMOL) пространственных структур ChTx в составе комплекса с химерой $K_v1.2$ и $K_v2.1$ (336) и OSK1 было показано,

что *N*-конец пептида лучше подходит для присоединения к нему линкера с eGFP. *C*-Конец блокатора находится ближе к поровой области, поэтому присоединение флуоресцентного белка с этой стороны возможно повлияло бы на активность химерного белка вплоть до потери способности связываться с каналами. При этом *N*-конец удален от поровой области, что позволяет минимизировать контакты флуоресцентного модуля и канала.

6.5.2 Получение рекомбинантного eGFP-OSK1

Целевой ген химерного белка был фланкирован сайтами рестрикции *Nde*I и *Eco*RI, а также перед сайтом *Eco*RI был добавлен терминальный кодон. В триплете (AAG), кодирующем *C*-концевой остаток лизина флуоресцентного белка, произведена мононуклеотидная замена (GAG) таким образом, чтобы лизин (Lys) изменился на глутаминовую кислоту (Glu). Эта модификация была выполнена для того, чтобы обеспечить возможность селективного протеолиза по этому остатку с помощью эндопротеиназы Glu-C (**Рисунок 39 Б**). В структуре флуоресцентного белка присутствует большое количество остатков глутаминовой кислоты, но протеолиз по ним не идет ввиду высокой устойчивости «бочонка» eGFP, а молекула OSK1 имеет остаток Glu, «защищенный» от протеолиза последующим остатком пролина (Pro).

Ген eGFP-OSK1, кодирующий химеру флуоресцентного белка с токсином, получали методом ПЦР с использованием перекрывающихся праймеров (см. раздел 5.2.11). Для проведения экспрессии в бактериальной системе полученный ПЦР-продукт был встроен по сайтам *Nde*I и *Eco*RI в экспрессионный вектор pET-28a, несущий ген устойчивости к антибиотику канамицину (Kan), что позволяет контролировать его наличие в клетках за счет выращивания на селективной среде. Система предусматривает включение с *N*-конца в последовательность eGFP-OSK1 гексагистидинового участка для проведения очистки с помощью металл-хелатной хроматографии, а наличие регуляторной области (лактозного оперона) позволяют проводить контролируемую экспрессию с использованием ИПТГ в качестве индуктора. Плазмиду pET-28a, а также синтетический ген подвергли рестрикции ферментами *Nde*I и *Eco*RI, после чего провели лигирование по липким концам. После трансформации клеток *E. coli* XL1 Blue лигазной смесью был проведен селективный отбор клонов на среде с Kan. Все клоны были проанализированы с помощью ПЦР с использованием праймеров eGFP-f и OSK1-r, и в случае положительного ответа из каждого клона была выделена плазмида. После выделения плазмиды были отправлены на секвенирование в компанию Евроген, где процедуру проводили с использованием трех праймеров: T7 promoter (#69348-3), T7 terminator (#69337-3) и eGFP-r (см. **Таблицу 9**). Метод Сэнгера позволяет секвенировать последовательности длиной

400-700 н.п., поэтому использование трех праймеров полностью «перекрыло» нуклеотидную последовательность гена eGFP-OSK1. Полная нуклеотидная последовательность гена eGFP-OSK1, а также соответствующая этому гену аминокислотная последовательность представлены на **Рисунке 40**.

<u>M</u>	G	S	S	H	H	H	H	H	S	S	G	L	V	P	R	G	S	H	M	M	V	S	
<u>ATG</u>	GGC	AGC	AGC	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAC	AGC	AGC	GGC	CTG	GTG	CCG	CGC	GGC	AGC	CAT	ATG	ATG	GTG	AGC
K	G	E	E	L	F	T	G	V	V	P	I	L	V	E	L	D	G	D	V	N	G	H	K
AAG	GGC	GAG	GAG	CTG	TTC	ACC	GGG	GTG	GTG	CCC	ATC	CTG	GTC	GAG	CTG	GAC	GGC	GAC	GTA	AAC	GGC	CAC	AAG
F	S	V	S	G	E	G	E	G	D	A	T	Y	G	K	L	T	L	K	F	I	C	T	T
TTC	AGC	GTG	TCC	GGC	GAG	GGC	GAG	GGC	GAT	GCC	ACC	TAC	GGC	AAG	CTG	ACC	CTG	AAG	TTC	ATC	TGC	ACC	ACC
G	K	L	P	V	P	W	P	T	L	V	T	T	L	T	Y	G	V	Q	C	F	S	R	Y
GGC	AAG	CTG	CCC	GTG	CCC	TGG	CCC	ACC	CTC	GTG	ACC	ACC	CTG	ACC	TAC	GGC	GTG	CAG	TGC	TTC	AGC	CGC	TAC
P	D	H	M	K	Q	H	D	F	F	K	S	A	M	P	E	G	Y	V	Q	E	R	T	I
CCC	GAC	CAC	ATG	AAG	CAG	CAC	GAC	TTC	TTC	AAG	TCC	GCC	ATG	CCC	GAA	GGC	TAC	GTC	CAG	GAG	CGC	ACC	ATC
F	F	K	D	D	G	N	Y	K	T	R	A	E	V	K	F	E	G	D	T	L	V	N	R
TTC	TTC	AAG	GAC	GAC	GGC	AAC	TAC	AAG	ACC	CGC	GCC	GAG	GTG	AAG	TTC	GAG	GGC	GAC	ACC	CTG	GTG	AAC	CGC
I	E	L	K	G	I	D	F	K	E	D	G	N	I	L	G	H	K	L	E	Y	N	Y	N
ATC	GAG	CTG	AAG	GGC	ATC	GAC	TTC	AAG	GAG	GAC	GGC	AAC	ATC	CTG	GGG	CAC	AAG	CTG	GAG	TAC	AAC	TAC	AAC
S	H	N	V	Y	I	M	A	D	K	Q	K	N	G	I	K	V	N	F	K	I	R	H	N
AGC	CAC	AAC	GTC	TAT	ATC	ATG	GCC	GAC	AAG	CAG	AAG	AAC	GGC	ATC	AAG	GTG	AAC	TTC	AAG	ATC	CGC	CAC	AAC
I	E	D	G	S	V	Q	L	A	D	H	Y	Q	Q	N	T	P	I	G	D	G	P	V	L
ATC	GAG	GAC	GGC	AGC	GTG	CAG	CTC	GCC	GAC	CAC	TAC	CAG	CAG	AAC	ACC	CCC	ATC	GGC	GAC	GGC	CCC	GTG	CTG
L	P	D	N	H	Y	L	S	T	Q	S	A	L	S	K	D	P	N	E	K	R	D	H	M
TTG	CCC	GAC	AAC	CAC	TAC	CTG	AGC	ACC	CAG	TCC	GCC	CTG	AGC	AAA	GAC	CCC	AAC	GAG	AAG	CGC	GAT	CAC	ATG
V	L	L	E	F	V	T	A	A	G	I	T	L	G	M	D	E	L	Y	E	G	G	G	G
GTC	CTG	CTG	GAG	TTC	GTG	ACC	GCC	GCC	GGG	ATC	ACT	CTC	GGC	ATG	GAC	GAG	CTG	TAC	GAG	GGA	GGC	GGT	GGC
S	G	G	G	G	S	G	G	G	G	S	G	V	I	I	N	V	K	C	K	I	S	R	Q
TCG	GGA	GGT	GGC	GGT	TCG	GGC	GGT	GGC	GGC	TCC	GGG	GTG	ATA	ATA	AAT	GTG	AAG	TGT	AAA	ATT	TCT	CGT	CAA
C	L	E	P	C	K	K	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P
TGT	TTG	GAA	CCA	TGC	AAG	AAG	GCT	GGA	ATG	AGA	TTT	GGA	AAA	TGC	ATG	AAT	GGC	AAA	TGC	CAT	TGC	ACA	CCT
K	<u>STOP</u>																						
AAG	<u>TGA</u>																						

Рисунок 40. Полная нуклеотидная последовательность гена eGFP-OSK1, а также соответствующая этому гену аминокислотная последовательность. Подчеркнуты стартовый и стоп-кодоны. Разными цветами обозначены функциональные элементы химерного белка: фиолетовым – His-Tag, зеленым – eGFP, синим – OSK1, серым – линкерные участки, и красным – мутантный остаток глутаминовой кислоты.

После подтверждения отсутствия ошибок в нуклеотидной последовательности гена eGFP-OSK1 несущий вектор был использован для трансформации клеток *E. coli* BL21(DE3). Проведена качественная оценка возможности экспрессии гена целевого белка: индукция экспрессии ИПТГ с последующей визуализацией результатов с помощью ДСН-ПААГ электрофореза (**Рисунок 41**). Аналитические эксперименты по экспрессии проводили в трех независимых повторах (использовали три различных клон *E. coli*, полученные при трансформации). Оценка электрофоретической подвижности eGFP-OSK1 в ДСН-ПААГ позволила установить, что молекулярная масса химерного белка

соответствует ожидаемой (~35 кДа). Правильность сворачивания модулей химерного белка анализировали по наличию поглощению в УФ, а также по способности связываться с K^+ каналами (см. раздел 6.5.3).

После этого был выбран один из экспрессионных клонов и проведена препаративная наработка целевого продукта. Индукция экспрессии осуществлялась в культуре объемом 0,4 л, а для выделения гибридного белка из фракции растворимых компонентов клеток *E. coli* использовался метод аффинной хроматографии, основанный на селективном металл-хелатном взаимодействии гексагистидинового участка экспрессированного продукта и ионов Co^{2+} на неподвижной фазе TALON Superflow.

Очищенный химерный белок был проанализирован с использованием электрофореза (Рисунок 41 А), а концентрация определялась по спектру поглощения в УФ-области. Выход целевого продукта составил ~20 мг с 1 л культуры. Дальнейшую очистку проводили с помощью эксклюзионной хроматографии на колонке TSK 2000SW, используя в качестве элюирующего раствор F_1 (Рисунок 41 А). Для концентрирования полученного раствора химерного белка использовали центрифужные ультрафильтры Amicon Ultra-15 с пропускной способностью до 10 кДа.

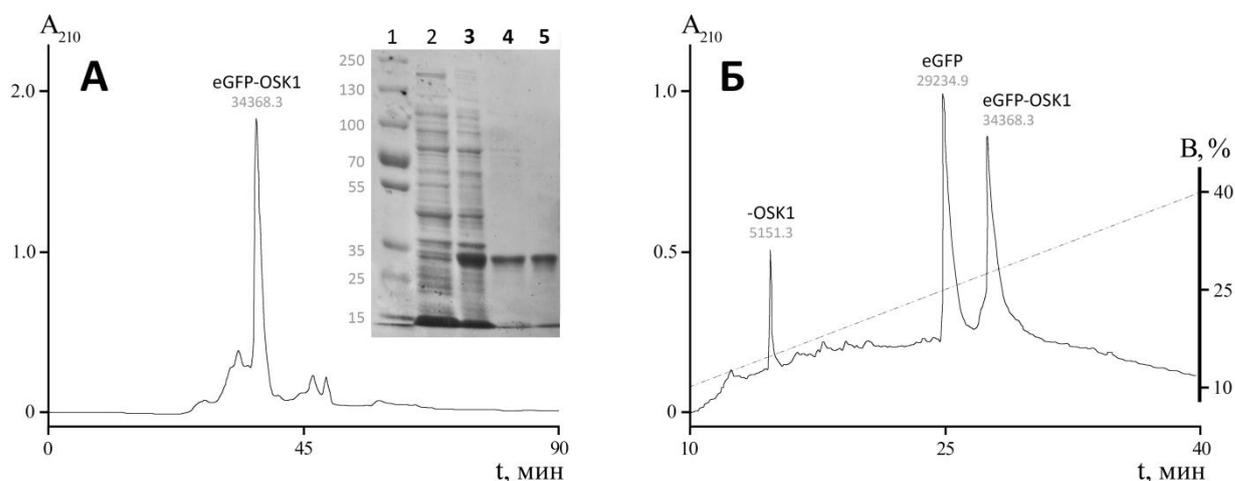


Рисунок 41. А – очистка рекомбинантного eGFP-OSK1 с использованием эксклюзионной хроматографии на колонке TSK. Вставка: электрофоретическое разделение образцов, полученных в ходе выделения химерного белка eGFP-OSK1 в 12% полиакриламидном геле в присутствии ДСН. Дорожка 1 – молекулярные стандарты, 2 – суммарный клеточный белок *E. coli* BL21(DE3) до индукции, 3 – после индукции 0,5 мМ ИПТГ; 4 – химерный белок после аффинной хроматографии, 5 – химерный белок после дополнительной стадии очистки эксклюзионной хроматографией. Слева указаны молекулярные массы использованных стандартов в кДа. Б – разделение фрагментов eGFP-OSK1 после расщепления химерного белка Glu-C с помощью ОФ-ВЭЖХ в линейном градиенте ацетонитрила. Обозначены фракции (-OSK1 – соответствует OSK1 с полноразмерным линкером $(G_4S)_3$ на *N*-конце), а также молекулярные массы, соответствующие нерасщепленному белку и фрагментам.

Химерный белок был гидролизован по остатку глутаминовой кислоты (последний аминокислотный остаток eGFP) с помощью эндопротеиназы Glu-C. Фрагменты были разделены с помощью ОФ-ВЭЖХ и идентифицированы, используя масс-спектрометрию (Рисунок 41 Б). Фрагмент, содержащий OSK1 с линкером на N-конце, был отобран для дальнейшего исследования.

6.5.3 Физиологическая характеристика eGFP-OSK1

Для eGFP-OSK1 были измерены спектры поглощения и испускания, которые оказались идентичными спектрам нативного eGFP без лигандного модуля (Рисунок 42 А). Было показано, что химерный белок способен взаимодействовать с гибридными каналами KcsA-K_v1.1 и KcsA-K_v1.3, экспрессированными в *E. coli*. Связывания нативного eGFP с этими же клетками, а также связывание eGFP-OSK1 с клетками, лишенными каналов, не наблюдалось (Рисунок 42 Б, В).

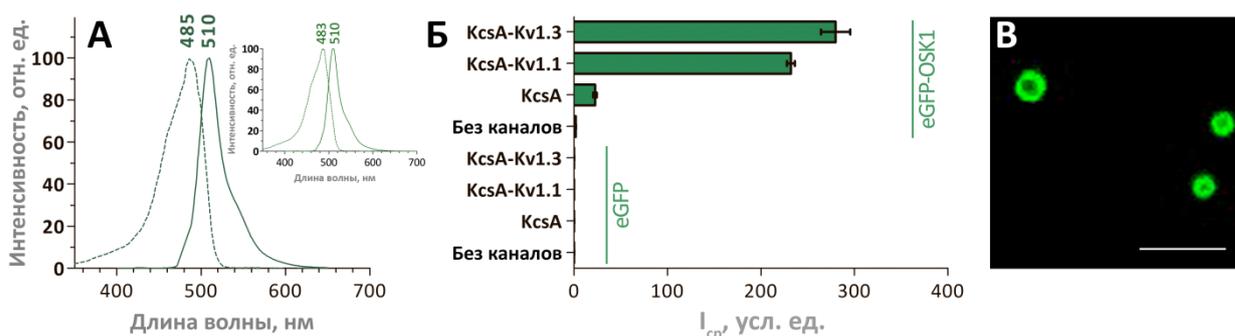


Рисунок 42. А – спектры поглощения (пунктирная линия) и испускания (сплошная линия) eGFP-OSK1. Во вставке показаны спектры поглощения и испускания eGFP. Б – тестирование взаимодействия eGFP-OSK1 (20 нМ) и eGFP (20 нМ) со сферопластами, несущими на поверхности KcsA-K_v1.3, KcsA-K_v1.1 и KcsA, а также со сферопластами без рекомбинантных каналов. В – характерное конфокальное изображение сферопластов, несущих на поверхности KcsA-K_v1.3, обработанных eGFP-OSK1. Масштаб – 4 мкм.

eGFP-OSK1 продемонстрировал кажущиеся константы диссоциации (K_{ap}) порядка 3,2 и 1,9 нМ на гибридных каналах KcsA-K_v1.1 и KcsA-K_v1.3, соответственно. Связывание было специфическим и обратимым: химерный белок вытеснялся из комплексов с гибридными каналами другими поровыми блокаторами, такими как OSK1, AgTx2 и ТЭА (Рисунок 43). K_{ap} , рассчитанные для этих лигандов по вытеснению eGFP-OSK1, оказались близкими значениями из литературы: в наномолярном диапазоне для OSK1 и AgTx2 и в миллимолярном – для ТЭА (Таблица 16).

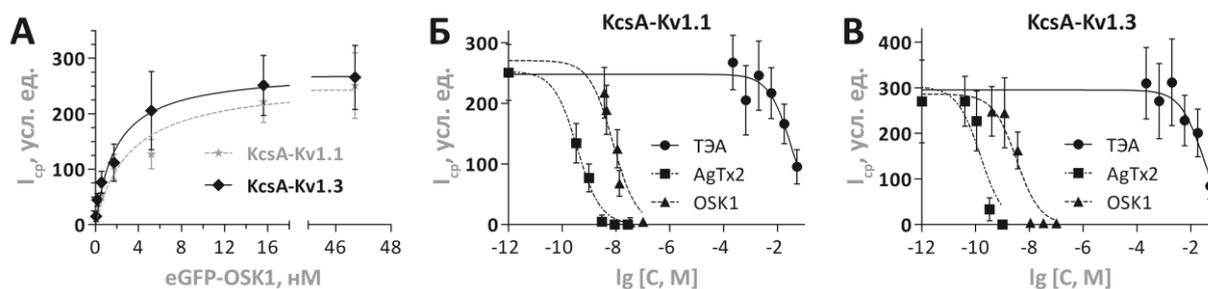


Рисунок 43. А – кривые насыщения связывания eGFP-OSK1 с KcsA-Kv1.1 и KcsA-Kv1.3 на поверхности сферопластов. Б, В – конкурентное вытеснение eGFP-OSK1 другими лигандами (ТЭА, AgTx2 и OSK1) из комплекса с гибридными KcsA-Kv1.1 или KcsA-Kv1.3 каналами.

Таблица 16. Кажущиеся константы диссоциации (K_{ap}) комплексов различных поровых блокаторов и гибридных каналов, рассчитанные по конкурентному вытеснению eGFP-OSK1.

Лиганд	$K_{ap}(KcsA-Kv1.1)$, нМ	$K_{ap}(KcsA-Kv1.3)$, нМ
ТЭА	$(6,5 \pm 1,8) \times 10^6$	$(6,1 \pm 1,8) \times 10^6$
AgTx2	$0,067 \pm 0,012$	$0,03 \pm 0,02$
OSK1	$1,42 \pm 0,52$	$0,7 \pm 0,3$

Для подтверждения физиологической активности eGFP-OSK1 на K_v каналах был использован метод двухэлектродной фиксации потенциала. Химерная молекула была протестирована на $K_v1.1$ - $K_v1.6$ каналах, а ее активность была сопоставлена с активностью нативного OSK1 на тех же мишенях (**Рисунок 44 А, Б**). Полное отсутствие эффекта для OSK1 и eGFP-OSK1 наблюдалось на $K_v1.4$ и $K_v1.5$ каналах в максимальной концентрации 1 мкМ. Химерная молекула, в отличие от нативного токсина, потеряла способность блокировать $K_v1.2$ даже в концентрации 10 мкМ.

Для каналов, на которых наблюдался эффект нативного OSK1 и eGFP-OSK1 ($K_v1.1$, $K_v1.3$ и $K_v1.6$), были построены кривые «доза-ответ» (**Рисунок 44 В**). Рассчитанные значения концентрации полуингибирования (IC_{50}) для OSK1 и eGFP-OSK1, а также соответствующие коэффициенты Хилла представлены в **Таблице 17**.

Таблица 17. Сравнение значений IC_{50} для OSK1 и eGFP-OSK1, а также соответствующие коэффициенты Хилла (h).

Лиганд	$K_v1.1$		$K_v1.3$		$K_v1.6$	
	IC_{50} , нМ	h	IC_{50} , нМ	h	IC_{50} , нМ	h
OSK1	72 ± 14	$0,8 \pm 0,1$	6 ± 2	$1,1 \pm 0,2$	71 ± 11	$0,9 \pm 0,1$
eGFP-OSK1	90 ± 17	$0,9 \pm 0,1$	8 ± 2	$1,0 \pm 0,1$	66 ± 5	$1,1 \pm 0,1$

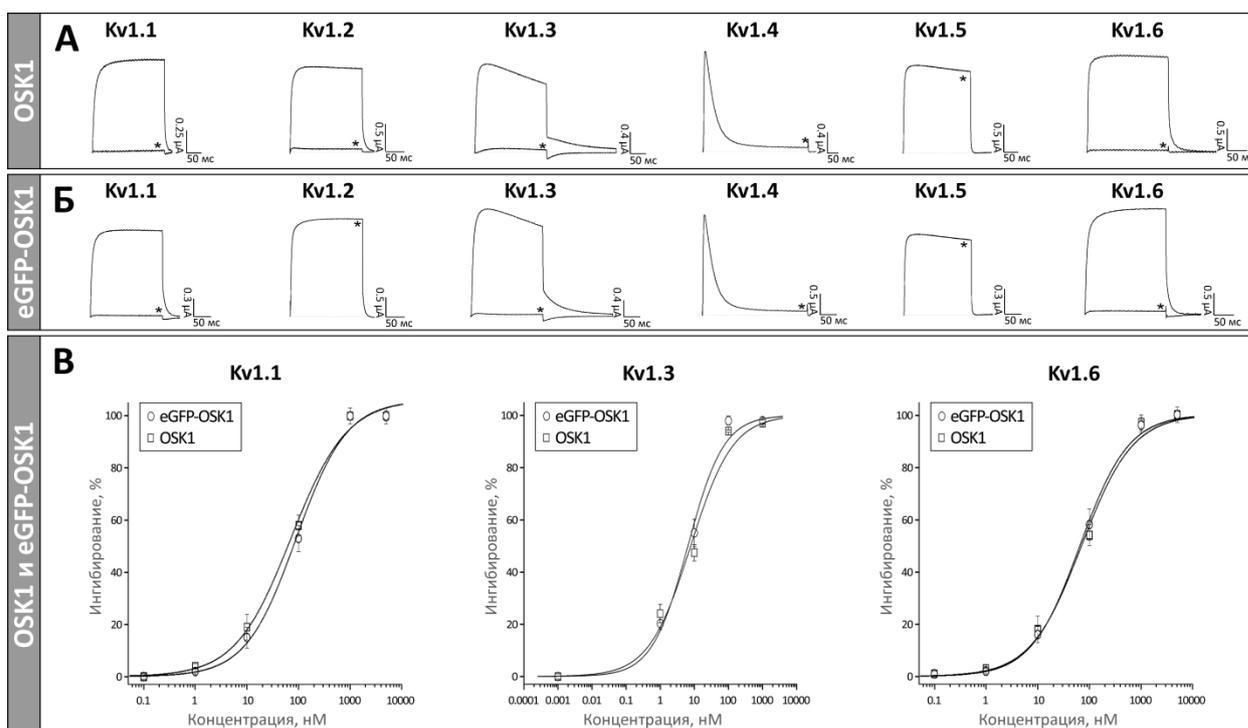


Рисунок 44. Тестирование активности eGFP-OSK1 с помощью электрофизиологических измерений. Показаны кривые записей токов через $K_v1.1-1.6$ каналы в контрольных образцах и после добавления: А – 1 мкМ OSK1, Б – 1 мкМ eGFP-OSK1. В – кривые «доза-ответ» для OSK1 и eGFP-OSK1, полученные на $K_v1.1$, $K_v1.3$ и $K_v1.6$.

6.5.4 Использование eGFP-OSK1 в скрининговых технологиях

Было показано, что химерный белок eGFP-OSK1 может быть использован для скрининга в совокупности с флуоресцентной системой на основе сферопластов с гибридными каналами. Для демонстрации этого некоторые лиганды K^+ каналов, а также цельный яд четырех паукообразных был протестирован на способность вытеснять eGFP-OSK1 из комплекса с KcsA- $K_v1.3$ на поверхности сферопластов (**Рисунок 45**). Как и предполагалось, такие поровые блокаторы, как харибдотоксин (ChTx) (283) и калиотоксин (КТХ) (282), при избыточной концентрации вытесняли eGFP-OSK1 из комплексов с KcsA- $K_v1.3$. Наоборот, сцилатоксин (ScTx) (330) – блокатор SK_{Ca} , а также 4-АП – низкомолекулярный лиганд, который связывается с другим сайтом K_v каналов (400), – не показали никакого эффекта. Скрининг четырех ядов паукообразных продемонстрировал наличие поровых блокаторов $K_v1.3$ в яде скорпионов *M. eupeus* и *O. scrobiculosus*, в отличие от яда пауков *Poecilotheria fasciata* и *Pterinochilus murinus*, где подобных лигандов обнаружено не было (**Рисунок 45**).

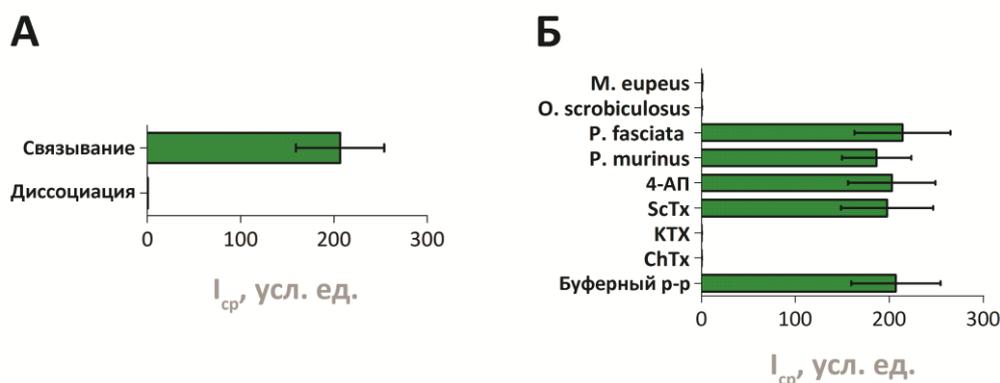


Рисунок 45. Применение eGFP-OSK1 с флуоресцентной системой на базе сферопластов для поиска поровых блокаторов K^+ каналов. А – обратимость связывания eGFP-OSK1 с KcsA-K_v1.3 на поверхности сферопластов. Полоса «Связывание» обозначает интенсивность сигнала от сферопластов, которые инкубировались с eGFP-OSK1 (5,6 нМ, 2 часа при 37°C), а полоса «Диссоциация» обозначает интенсивность сигнала от тех же самых сферопластов, которые далее инкубировались в среде без eGFP-OSK1 в течение 4 часов. Б – влияние различных биологических смесей (цельных ядов *M. eupeus*, *O. scrobiculosus*, *P. fasciata* и *P. murinus*), а также отдельных поровых блокаторов K^+ каналов (ChTx, КТХ, ScTx и 4-АП) на связывание eGFP-OSK1 с гибридными каналами на поверхности сферопластов.

6.5.5 Использование eGFP-OSK1 для визуализации hK_v1.3, временно экспрессированных в клетках НЕК293Т

Для визуализации K^+ каналов с помощью химерного белка eGFP-OSK1 были получены клетки НЕК293Т, временно экспрессирующие гомотетрамерные K_v1.3 каналы человека (hK_v1.3). Химерный белок (50 нМ) продемонстрировал способность связываться с hK_v1.3 как на пермеабелизованных, так и на интактных клетках. Изолированный флуоресцентный белок eGFP без лигандного модуля не связывался с трансфицированными клетками вплоть до концентрации 1 мкМ, а химерный белок eGFP-OSK1 не связывался с клетками НЕК293Т, не экспрессирующими ген K_v1.3. Положительным контролем выступили коммерчески доступные антитела к hK_v1.3, показавшие идентичную картину окрашивания пермеабелизованных НЕК293Т. Кроме того, специфичность взаимодействия eGFP-OSK1 с hK_v1.3 была подтверждена вытеснением флуоресцентной химеры из комплекса с каналом «холодным» лигандом OSK1. Фотографии полученных характерных флуоресцентных изображений представлены на **Рисунке 46**.

6.5.6 Применение eGFP-OSK1 для локализации K^+ каналов на срезах мозжечка крысы

Химерный белок eGFP-OSK1 был использован для локализации K_v каналов на срезах мозжечка крысы. Для этого фронтальные вибротомные срезы мозжечка крысы толщиной 200 мкм были обработаны раствором eGFP-OSK1 (50 нМ) в буфере F₁.

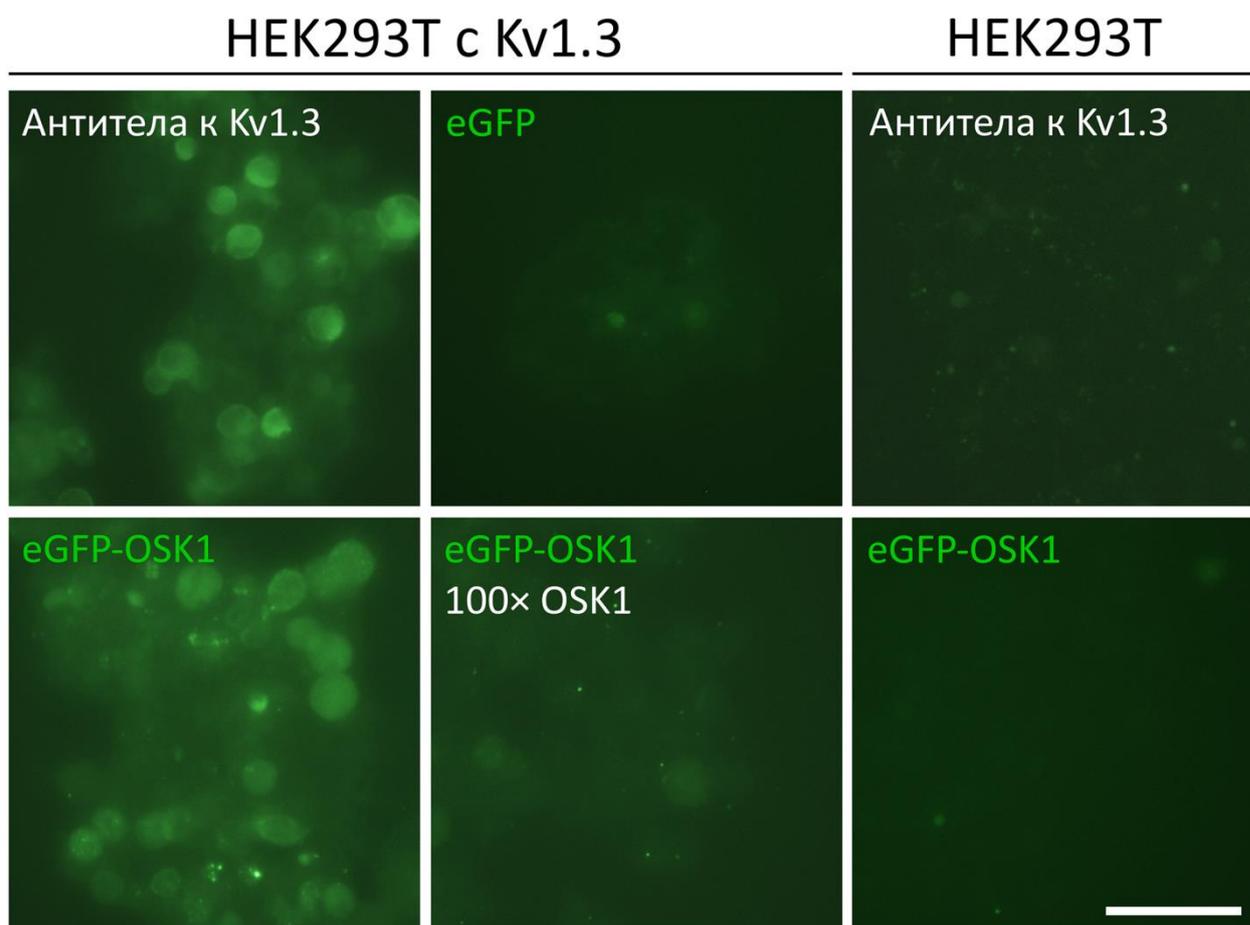


Рисунок 46. Визуализация $K_v1.3$ на поверхности клеток HEK293T, временно экспрессирующих эти каналы. Левые верхняя и нижняя картинка – флуоресцентные изображения, полученные при обработке клеток HEK293T антителами против $K_v1.3$ (анти- $K_v1.3$) и eGFP-OSK1, соответственно. Средние верхняя и нижняя картинка – флуоресцентные изображения клеток HEK293T с $K_v1.3$, обработанных eGFP и eGFP-OSK1 в присутствии 100-кратного избытка OSK1, соответственно. Справа показаны клетки HEK293T без $K_v1.3$, обработанные антителами (сверху) и eGFP-OSK1 (снизу). Масштаб – 50 мкм.

В качестве отрицательного контроля использовались срезы, обработанные тем же раствором, содержащим eGFP без модуля OSK1 (в максимальной концентрации 1 мкМ) вместо eGFP-OSK1. С помощью eGFP-OSK1 удалось визуализировать окончания Пинсо (синаптические структуры, образованные сплетением аксонов корзинчатых клеток вокруг аксона клеток Пуркинье (401), где наблюдается высокая экспрессия K_v), располагающиеся на границе гранулярного и молекулярного слоев коры мозжечка. Кроме того, на большинстве образцов наблюдалась визуализация K_v на поверхности нервных волокон, и в некоторых случаях она имела выраженную кластеризацию (**Рисунок 47**). Результаты данного исследования сопоставимы с опубликованными работами, где для визуализации K_v использовались специфические антитела (402).

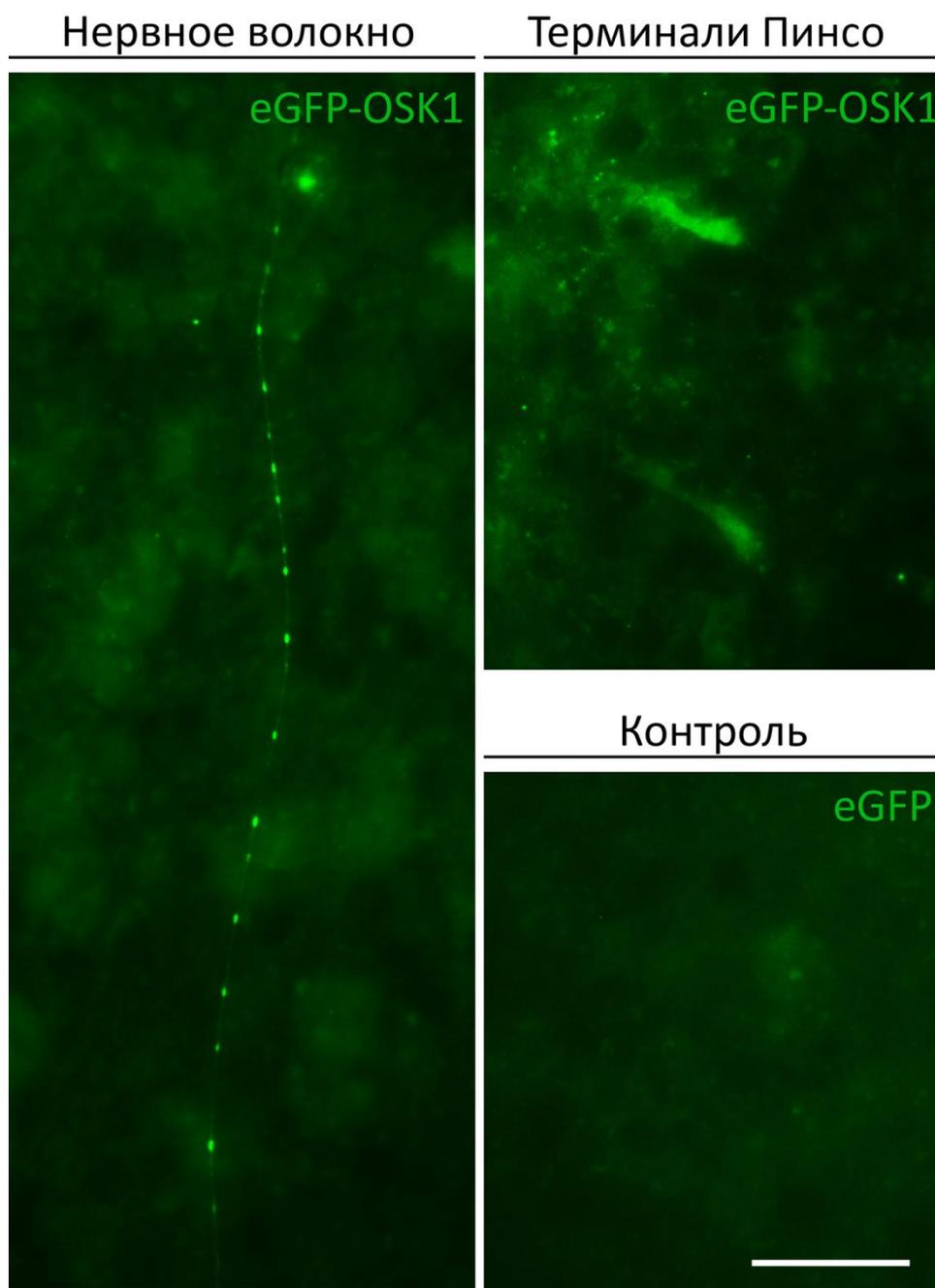


Рисунок 47. Локализация K_v каналов с помощью eGFP-OSK1 на вибротомных срезах мозжечка крысы. Видна кластеризация K_v на отдельном нервном волокне (слева), а также в окончаниях Пинсо (справа). Отсутствие неспецифического окрашивания подтверждено в контрольном эксперименте с использованием eGFP. Масштаб – 20 мкм.

6.5.7 Визуализация K^+ каналов с помощью eGFP-OSK1 на поверхности Т-лимфоцитов мыши

Известно, что после активации Т-лимфоцитов у некоторых субпопуляций, характеризующихся $CD4^+$ или $CD8^+$ профилями поверхностных антигенов, увеличивается экспрессия $K_v1.3$ на поверхности. Подобные фенотипические проявления возможны, например, при развитии некоторых аутоиммунных заболеваний, таких как рассеянный склероз, ревматоидный артрит и диабет I типа (363).

В данной работе Т-лимфоциты из периферической крови мыши подвергались нескольким раундам активации *in vitro*, что способствовало гиперэкспрессии $K_v1.3$ на поверхности клеток. В качестве контроля использовались неактивированные клетки. Для визуализации $K_v1.3$ на поверхности Т-лимфоцитов был проведен анализ активированных и неактивированных $CD8^+$ клеток, преинкубированных с eGFP-OSK1 или eGFP, с помощью проточной цитометрии. Было показано, что при активации *in vitro*, количество $CD8^+$ клеток с повышенной экспрессией $K_v1.3$ – возрастает в 4 раза. При этом, обе популяции (активированные и неактивированные клетки) не взаимодействовали с eGFP без модуля OSK1 (**Рисунок 48**).

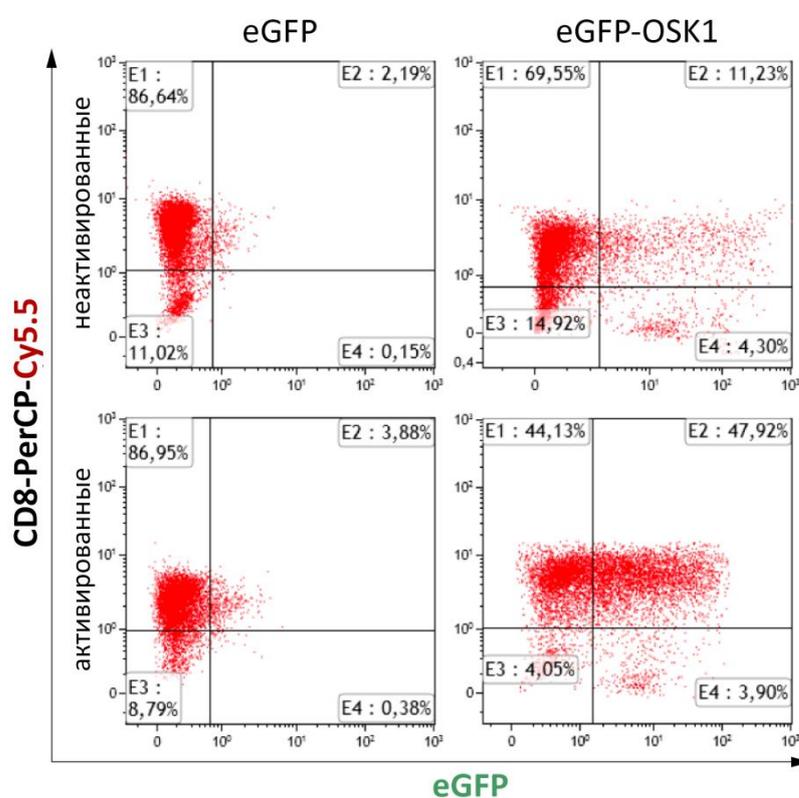


Рисунок 48. Использование eGFP-OSK1 для визуализации K^+ каналов на поверхности Т-лимфоцитов. Анализ $CD8^+$ Т-лимфоцитов проводился с помощью проточной цитометрии. В качестве отрицательного контроля использовался eGFP.

ОБСУЖДЕНИЕ

7.1 Актуализация современной классификации КТх

В настоящее время порядка 250 аннотированных КТх представлено в базе данных UniProt. Большинство из этих полипептидов было выделено из яда напрямую (282, 403), но первичные структуры нескольких десятков были предсказаны, исходя из анализа транскриптомов (404, 405). Часть транскриптомных данных представлена в UniProt как неаннотированные токсины – полипептидные последовательности, для которых нет информации на белковом уровне и следовательно физиологической характеристики (298). Присутствие качественно идентичных данных в двух разных группах (аннотированные и неаннотированные токсины) кажется нелогичным.

В данной работе была разработана специализированная база данных – Kalium, в которой представлен исчерпывающий список КТх, структурные данные для всех молекул, а также информация об их физиологической активности. Главными особенностями Kalium являются четкие критерии систематизации токсинов: аннотированными считаются лишь те КТх, для которых доступна информация на белковом уровне, а также известна полная аминокислотная последовательность (на сегодняшний день – 174 КТх). Кроме того, была проведена классификация для β -КТх и добавлено новое семейство λ -КТх.

Kalium – база данных, имеющая свободный доступ и размещенная на домене .org (www.kaliumdb.org). База данных обновляется, используя как основу – UniProt. Каждое обновление требует участия администратора, который подтверждает или опровергает информацию о новых токсинах, а также вносит данные по физиологическим активностям. Панель администратора доступна нескольким аффилированным исследователям в различных странах.

7.2 Яд скорпионов как источник блокаторов K^+ каналов

В настоящее время основными источниками полипептидных лигандов K^+ каналов являются яды лишь нескольких групп животных, а именно: змей, морских анемонов, конусов, пчел, пауков и скорпионов (см. раздел 3.2.2). Для паукообразных (пауки и скорпионы) характерна одна интересная особенность: практически все лиганды K^+ каналов из яда пауков – ингибиторы активации (исключая токсины с укладкой типа Кунитца, являющиеся поровыми блокаторами), а скорпионов – классические поровые блокаторы. В данной работе были протестированы яды 21 вида пауков на наличие блокаторов K^+ каналов, и ни один из них не показал искомой активности. Напротив, яды почти всех (5 из 6) скорпионов продемонстрировали значительный блокирующий эффект.

Полученный результат согласуется с современными представлениями в данной области. Больше половины всех полипептидных лигандов K^+ каналов выделены из яда скорпионов, что позволяет с уверенностью говорить о высоком потенциале этих биологических смесей.

7.3 Стратегии поиска и идентификации КТх

7.3.1 Использование регулярных выражений для анализа транскриптомных библиотек

Современные исследования яда скорпионов могут базироваться на трех наборах данных: геномных, транскриптомных и протеомных (пептидомных). В настоящее время полногеномное секвенирование произведено лишь для двух видов скорпионов: *Centruroides exilicauda* и *Mesobuthus martensii* (192). Поэтому, стратегия поиска новых КТх, базируясь лишь на геномных данных, пока не получила широкого распространения. В то же время большинство современных исследований все чаще включают в себя анализ данных, полученных при секвенировании транскриптомов (406, 407) и формирование баз данных на их основе. Для яда некоторых скорпионов таким образом было предсказано большое количество новых полипептидов (299, 408, 409). Тем не менее, именно протеомные данные остаются главным источником информации в исследованиях яда скорпионов, потому как наиболее интересными объектами изучения является полипептидные токсины (см. раздел 3.2.2).

Существует несколько подходов анализа транскриптомных данных: сопоставление транскриптомных и протеомных данных, полученных в ходе секвенирования полипептидов по Эдману или с помощью масс-спектрометрии; анализ в ручном режиме, подразумевающий работу с каждой последовательностью из базы данных отдельно; анализ последовательностей из баз данных с помощью алгоритмов BLAST (поиск сходных последовательностей в глобальных базах данных); анализ посредством регулярных выражений – с использованием специфических мотивов первичной структуры транслированных полипептидов (**Рисунок 49**). Для реализации первого подхода необходимы два массива данных: транскриптомная информация, полученная, например, из ядовитых желез скорпиона, а также протеомные данные (массовое секвенирование полипептидов из яда, масс-спектрометрический анализ яда или анализ гидролизатов яда). Подобные исследования достаточно редки ввиду технической сложности экспериментальной части и трудоемкости. Анализ в ручном режиме достаточно универсален и позволяет найти практически все интересующие последовательности в транскриптоме. При этом подходе, требующим огромных временных ресурсов, каждая

последовательность анализируется исследователем шаг за шагом доступным набором инструментов. Анализ последовательностей с помощью алгоритмов BLAST позволяет выполнить быстрое сравнение исследуемой базы с различными глобальными базами данных. Ограничением такого подхода может служить отсутствие значимого сходства последовательностей из исследуемой базы данных с последовательностями из глобальных баз данных. Это довольно распространенная ситуация, когда речь идет о новых компонентах из яда. Анализ посредством регулярных выражений позволяет задавать шаблон поиска в первичной структуре полипептидов. Ограничением данного подхода является невозможность поиска среди последовательностей без специфического мотива, даже для хорошо изученных полипептидов (например, для линейных цитолитических пептидов). Кроме того, этот подход не позволяет различать молекулы, имеющие одинаковый мотив на уровне первичной структуры, но различающиеся по пространственной укладке. Например, токсин Ts16 из скорпиона *Tityus trivittatus* имеет характерное для токсинов с фолдом CS α / β расположение цистеинов (и соответствующее регулярное выражение), но у него реализуется необычное расположение дисульфидных связей. Пространственная структура Ts16 представлена фолдом CS α / α вместо CS α / β (294). В отличие от BLAST, анализ транскриптомных данных с помощью регулярных выражений позволяет находить уникальные последовательности (не имеющими сходства с известными токсинами).



Рисунок 49. Методы анализа транскриптомных данных. А – сопоставление транскриптомных данных с данными протеомного анализа, Б – анализ транскриптомных данных в ручном режиме с применением всех доступных инструментов (выравнивание и BLAST), В – анализ с помощью BLAST, Г – анализ с помощью регулярных выражений. Круги обозначают соответствующие множества, а их размер – количество последовательностей получаемых при применении того или иного подхода.

Все КТх представляют собой дисульфид-содержащие полипептиды, и соответствующие регулярные выражения могут быть составлены для каждого отдельного мотива: $CS\alpha/\alpha$, $CS\alpha/\beta$, ICK и типа Кунитца. В данной работе анализ транскриптомных данных, полученных из библиотек кДНК ядовитых желез *M.eupeus* и *O. scrobiculosus*, посредством регулярных выражений, позволил предсказать 56 и 9 КТх, соответственно.

7.3.2. Идентификация КТх с помощью флуоресцентной системы в комбинации с многостадийной хроматографией

Яд скорпионов – сложная смесь нескольких десятков компонентов, и подробные исследования активных соединений даже из одного яда могут занимать более 30 лет (410, 411). Библиотеки кДНК, составленные на основе транскриптомных данных, предоставляют значительную информацию о возможной первичной структуре полипептидов, однако в дальнейшем требуется непосредственное подтверждение присутствия этих активных компонентов в яде. Существуют различные подходы для направленного поиска активных компонентов, основными из которых являются электрофизиологические методы и радиолигандный анализ (см. раздел 3.2.2). Альтернативой радиолигандному выступает флуоресцентный анализ, часто использующийся в проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии (201, 202).

В данной работе для поиска активных компонентов в составе яда скорпионов *M. eupeus* и *O. scrobiculosus* использовался как раз флуоресцентный метод анализа. К сферопластам, несущим на поверхности гибридные $KcsA-K_v1.x$ ($x=1$ или 3) каналы, добавлялся флуоресцентно-меченый агитоксин-2 ($R-AgTx2$), а активность ядов, фракций и отдельных компонентов оценивалась по способности вытеснять $R-AgTx2$ из комплексов с гибридными каналами. Работоспособность этой флуоресцентной системы, а также достоверность получаемых результатов были подтверждены на таких хорошо изученных лигандах, как КТХ, $AgTx2$, OSK1 и ТЭА. Было показано что значения K_d , измеренные с помощью электрофизиологических методов и флуоресцентного подхода, сопоставимы. Среди исследуемых лигандов только 4-АП не вытеснял $R-AgTx2$ из комплексов с гибридными каналами, так как сайт его связывания находится во внутренней части поры (400, 412). Другой низкомолекулярный лиганд – ТЭА, имеющий тот же сайт связывания, что и $R-AgTx2$, успешно вытеснял флуоресцентно-меченый токсин из комплекса с гибридными каналами (см. раздел 3.2.1). Подобный подход, в отличие от электрофизиологических методов, позволяет идентифицировать лишь лиганды, связывающиеся с внешним вестибюлем K_v и конкурирующие за сайт связывания флуоресцентного лиганда.

Поиск идентификация новых лигандов в составе ядов *M. eurus* и *O. scrobiculosus* производились с помощью флуоресцентной системы на базе сферопластов в комбинации с многостадийным хроматографическим разделением, а также масс-спектрометрическим анализом. Использование данного подхода существенно понизило количество материала, необходимого для анализа, а также временные затраты по сравнению с традиционными методами. В ядах исследуемых скорпионов было обнаружено несколько лигандов K_v , существование большинства из которых было предсказано в ходе транскриптомного анализа, что существенно облегчило процедуру установления первичной структуры. Дальнейшие электрофизиологические исследования подтвердили достоверность полученных результатов: новые лиганды действительно являются поровыми блокаторами, а их значения IC_{50} лежат в области ниже 1 мкМ.

7.3.3 Разнообразие КТх в яде *M. eurus* и *O. scrobiculosus*

Среди пяти известных структурных мотивов блокаторов K^+ каналов из яда скорпионов (291) лидирующую позицию по распространенности занимает фолд $CS\alpha/\beta$. Порядка 90% всех аннотированных КТх из UniProt содержат этот мотив, а токсины с другими фолдами составляют менее 10%. Среди токсинов с мотивом $CS\alpha/\beta$ самыми распространенными являются α -КТх, составляющие порядка 65% от общего числа КТх (см. раздел 3.2.2.6.1). Основным источником таких полипептидов выступают яды скорпионов семейства Buthidae (порядка 80% известных α -КТх). Все известные α -КТх объединены более чем в 25 семейств, согласно сходству аминокислотных последовательностей (см. раздел 3.2.2.6.2).

Данные, полученные в ходе анализа транскриптома *M. eurus*, показали, что в яде этого скорпиона потенциально находится большое количество КТх. Транскриптомная библиотека кДНК из ядовитых желез *O. scrobiculosus* содержала гораздо меньшее число потенциальных КТх. Для наглядного представления сходства между зрелыми КТх были построены филогенетические деревья для каждого из скорпионов (**Рисунок 50**). Согласно сходству аминокислотных последовательностей все токсины были объединены в уже аннотированные и неаннотированные подсемейства.

Анализ литературных данных позволил показать, что большинство аннотированных подсемейств содержат КТх, действующие на K_v каналы. Исключениями являются подсемейства α -КТх 5, α -КТх 14, α -КТх 15, α -КТх 17, α -КТх 19, α -КТх 22, α -КТх 24 и α -КТх 25, которые содержат полипептиды, действующие на VK_{Ca} и IK_{Ca} каналы, или активность для которых до сих пор неизвестна. Блокаторы K_v1 главным образом принадлежат подсемействам α -КТх 1–4, α -КТх 6–8, α -КТх 10–13, α -КТх 16, α -КТх 18, α -

КТх 20, α -КТх 21 и α -КТх 23 (187, 413). В транскриптоме *M. eurus* и *O. scrobiculosus* были идентифицированы представители 12 и 5 аннотированных подсемейств α -КТх, соответственно. Из них только α -КТх 1, α -КТх 3, α -КТх 8 и α -КТх 16 согласно литературным данным могли содержать потенциальные блокаторы K_v . И действительно, дальнейшее исследование цельных ядов показало, что все полипептиды, активные на $K_{csA-Kv1.x}$ ($x=1$ или 3), принадлежат этим четырем подсемействам. Все эти КТх – короткие полипептиды, состоящие из 29–38 аминокислотных остатков, шесть из которых являются остатками цистеина, формирующими три внутримолекулярные дисульфидные связи. Некоторые α -КТх 3 (MeКТх13-2 и MeКТх13-3) имеют амидированный C-концевой аминокислотный остаток, а α -КТх 1 (MeКТх11-1 и MeКТх11-3) – N-концевой остаток пироглутаминовой кислоты. Токсины из всех четырех подсемейств имеют ключевой остаток лизина в консервативном положении (414). Порядковый номер этого аминокислотного остатка, начиная с N-конца, может быть различным и зависит от длины полипептидной цепи токсина, но во всех случаях это первый аминокислотный остаток перед четвертым цистеином.

Интересным кажется тот факт, что среди активных на K_v каналы КТх в яде *M. eurus* был обнаружен MeКТх13-3, первичная структура которого идентична VmКТХ – токсину, ранее выделенному из яда родственного вида *M. martensii* (415). Похоже, что присутствие идентичных токсинов в яде различных видов – распространенная ситуация для скорпионов: MeuТх3В из яда *M. eurus* имеет такую же аминокислотную последовательность, что и MegКТх3, выделенный из *Mesobuthus gibbosus* (300, 395). Кроме того, полипептиды с одинаковым названием «бутантоксин» и одинаковыми аминокислотными последовательностями были идентифицированы в яде *Tityus serrulatus*, *Tityus trivittatus* и *Tityus stigmurus* (416).

7.4 eGFP-OSK1 – прототип новых биомолекулярных инструментов на основе полипептидных токсинов

7.4.1 Роль токсинов в изучении ионных каналов

Традиционно изучение ионных каналов тесно сопряжено с исследованием природных токсинов, которые выполняют роль селективных молекулярных инструментов. Многие нейротоксины имеют уникальные свойства: они могут связываться с ионными каналами с чрезвычайно низкими значениями K_d , способны различать близкие изоформы ионных каналов, а также модифицировать их функции (блокировать, активировать, потенцировать и изменять кинетику работы) (247, 262, 319, 417). Например, Na^+ каналы

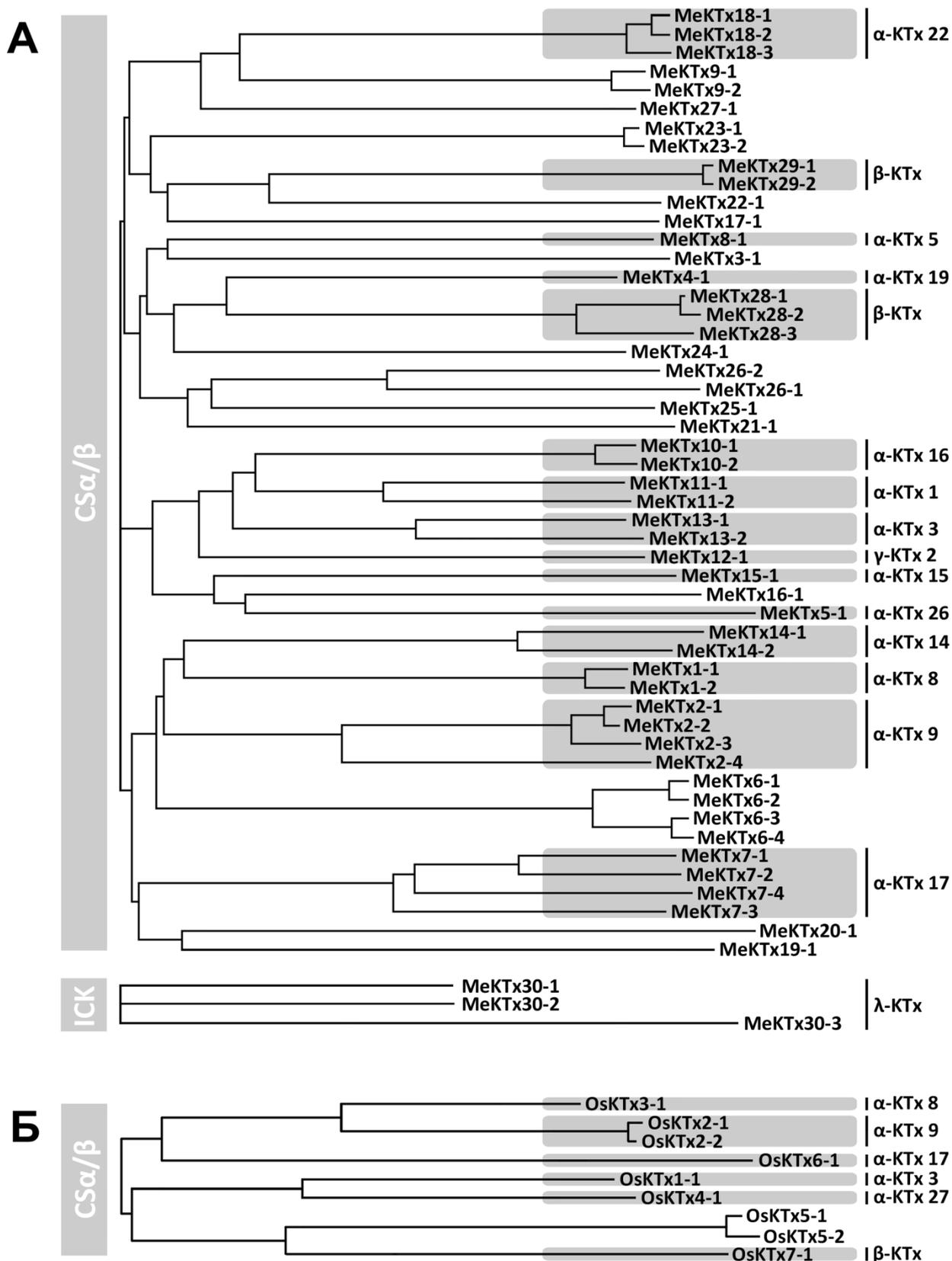


Рисунок 50. Филогенетические деревья зрелых КТх, полученных из анализа транскриптомных библиотек А – *M. eupaeus*, Б – *O. scrobiculosus*. Аннотированные подсемейства выделены серым цветом.

были впервые идентифицированы с использованием тетродотоксина (ТТХ) и α -токсинов скорпионов (418), а ацетилхолиновые рецепторы были выделены с помощью α -нейротоксинов змей (419). Современная классификация Ca^{2+} каналов базируется на их чувствительности к токсинам пауков и конусов, которые используются для различения этих мембранных белков до сих пор (420). В структурной биологии токсины широко используются для стабилизации ионных каналов в различных функциональных состояниях, таких как: открытое, закрытое или инактивированное (336, 421–423).

Следуя общей тенденции применения токсинов в области изучения ионных каналов, в данной работе были разработаны новые молекулярные инструменты на основе токсинов. Химерные молекулы, комбинирующие две функциональные части: флуоресцентный белок и полипептидный токсин – могут иметь большой потенциал для нейробиологии. Как известно, КТх имеют высокие значения аффинности и селективности к конкретным изоформам K^+ каналов, что было продемонстрировано в многочисленных физиологических исследованиях (см. раздел 3.3). В то же время, флуоресцентный белок служит сигнальным репортером места связывания токсина с ионным каналом. Анализ недавно полученной кристаллической структуры комплекса химерного $\text{K}_v1.2$ - $\text{K}_v2.1$ канала и ChTx (336) показал, что *N*-конец токсина, по-видимому, может быть модифицирован без потери активности молекулы. Это было подтверждено в дальнейшем с помощью электрофизиологических исследований. Однако, некоторые ограничения все же наблюдались, в частности, eGFP-OSK1 потерял активность на $\text{K}_v1.2$, что говорит об изменении свойств токсина в составе химерной молекулы. Использование гибкого линкера, по-видимому, необходимо для того, чтобы пространственно разнести лигандный и флуоресцентный модули. Получение eGFP-OSK1 характеризуется высоким выходом, составляющим ~10 мг белка с литра бактериальной культуры, а также простотой получения и технической доступностью практически для любой лаборатории. На **Рисунке 51** показан принцип взаимодействия eGFP-OSK1 с K_v каналом. Модель пространственной структуры eGFP-OSK1 была построена с помощью программы Modeller (интерфейс Chimera), а затем было произведено пространственное выравнивание модуля OSK1 с ChTx в составе комплекса с $\text{K}_v1.2$ - $\text{K}_v2.1$.

Альтернативным подходом в работах по визуализации ионных каналов служит применение в качестве зондов антител (424, 425) или токсинов, но с химическими модификациями (ковалентное присоединение флуоресцентных меток, см. раздел 3.3.1). Оба подхода не лишены недостатков: в случае применения антител это низкая селективность, отсутствие специфических моноклональных антител на различные изоформы ионных каналов, а также необходимость фиксировать и пермеабиллизовать

исследуемые образцы (большинство селективных антител существуют лишь для внутриклеточных эпитопов); получение химически модифицированных токсинов характеризуется низким выходом целевого продукта, большим количеством побочных продуктов (в том числе тех, которые теряют требуемую активность) и высокой себестоимостью (426). Новые биомолекулярные инструменты на основе флуоресцентного белка и токсина могут быть получены, используя лишь рекомбинантную технологию без каких-либо химических модификаций. Для успешного применения химерных белков не требуется предварительная обработка исследуемых образцов (фиксация и пермеабелизация).

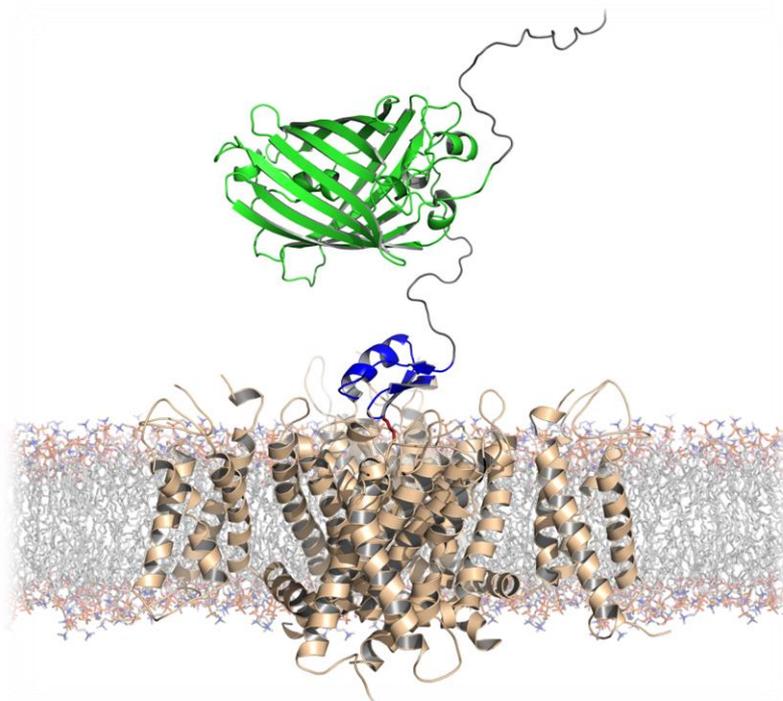


Рисунок 51. Молекулярная модель комплекса eGFP-OSK1 с K_v каналом. Модуль eGFP обозначен зеленым, OSK1 – синим, гибкий *N*-концевой участок химеры и $(G_4S)_3$ -линкер – серым. Функционально важный остаток лизина модуля OSK1 обозначен красным. Модель была построена на основе известных пространственных структур eGFP (PDB ID: 2Y0G), OSK1 (PDB ID: 1SCO) и кристаллической структуры комплекса $K_v1.2$ - $K_v2.1$ с ChTx (PDB ID: 4JTA).

7.4.2 Области применения нового биомолекулярного инструмента

В настоящей работе были показаны возможные области применения новой химерной молекулы eGFP-OSK1: 1) для поиска новых лигандов K^+ каналов, 2) для визуализации K_v на срезах мозжечка крысы и на поверхности клеток, 3) для детекции изменения количества ионных каналов при развитии заболевания.

Молекулы с таким дизайном могут быть успешно использованы в аналитических системах, направленных на поиск новых лигандов ионных каналов. Для подобных подходов различные флуоресцентные системы могут стать хорошими альтернативами

радиолигандному анализу и электрофизиологическим исследованиям. В данной работе было показано, что агитоксин-2 (AgTx2), меченный 5-карбокситетраметил-родамином (R-AgTx2), может быть успешно использован для скрининга комбинаторных библиотек и поиска новых лигандов K^+ каналов. С этой точки зрения eGFP-OSK1 не уступает по характеристикам R-AgTx2, обладая при этом значительными преимуществами: простота, низкая стоимость получения и возможность получить любые количества.

Наиболее распространенное применение флуоресцентных лигандов – визуализация ионных каналов в тканях и клетках (426–428). Подобные работы по локализации K_v на срезах мозжечка проводились ранее с использованием как антител, так и токсинов с флуоресцентными метками, присоединенными с помощью химических модификаций (356, 429). В данной работе было показано, что такие биомолекулярные инструменты, как eGFP-OSK1, могут быть использованы для визуализации K^+ каналов в клетках, временно экспрессирующих $K_v1.3$, а также на срезах мозжечка крысы. Коммерческие антитела были использованы для сравнения и продемонстрировали идентичную картину окрашивания на культуре HEK293T. Для применения большинства коммерчески доступных антител требуется предшествующая процедура пермеабиллизации, поскольку их эпитопы часто локализованы внутри клетки. Напротив, большинство токсинов, в том числе OSK1, связываются с внеклеточными участками ионных каналов. Используя «холодный» OSK1, было показано, что связывание eGFP-OSK1 с каналами обратимое и специфическое. С помощью eGFP-OSK1 также удалось визуализировать K_v в терминалях Пинсо и отдельных нервных волокнах на срезах мозжечка крысы. Известно, что эти терминали располагаются на границе гранулярного и молекулярного слоев коры мозжечка и характеризуются высокой экспрессией K_v1 каналов (402).

С помощью eGFP-OSK1 было проведено исследование по детекции и количественной оценке Т-лимфоцитов в повышенной экспрессией $K_v1.3$. Такой фенотип клеток наблюдается при развитии некоторых аутоиммунных заболеваний (см. раздел 3.3.2). Например, было достоверно показано, что гиперэкспрессия $K_v1.3$ в активированных Т-клетках памяти необходима для дальнейшей пролиферации, кальциевой сигнализации и продукции интерлейкина-2 и интерферона- γ . Подобно токсину ShK из морской анемоны, для которого ранее были получены флуоресцентные производные (с помощью химической модификации рекомбинантного полипептида), eGFP-OSK1 также эффективно окрашивал $K_v1.3^+$ клетки в экспериментах по фенотипическому анализу Т-лимфоцитов (201).

Предложенная концепция может быть распространена на другие флуоресцентные белки и токсины. Например, согласно Kalium, известно 174 КТх, для которых первичная

структура подтверждена на белковом уровне, а для некоторых из них показана высокая специфичность по отношению к определенным K^+ каналам (430). Подобные селективные токсины – главные кандидаты для создания химерных флуоресцентных молекул. Основными ограничениями здесь служат неполнота физиологических исследований для большинства токсинов, а также встречаемость в образцах не только гомомерных каналов (практически все эксперименты *in vitro*), но и гетеромерных комплексов (в таком виде множество ионных каналов встречается *in vivo*) (431). В настоящее время известны пространственные структуры некоторых комплексов природных токсинов с ионными каналами, в которых, как и в случае с ChTx и $K_v1.2$ - $K_v2.1$, *N*-конец токсина ориентирован в сторону от области контакта с мишенью. Эта информация может помочь при дизайне биомолекулярных инструментов на основе токсинов, например: α -нейротоксинов змей для визуализации ацетилхолинового рецептора (432), токсина PcTx1 из паука *Psalmopoeus cambridgei* – для кислоточувствительных ионных каналов (423) и токсина Con-ikot-ikot из улитки *Conus striatus* – для глутаматных рецепторов (422). Существующие модели взаимодействия α - и β -нейротоксинов скорпионов с Na^+ каналами (433, 434) также предсказывают наличие свободного *N*-конца у токсинов. Кроме того, использование широкого разнообразия флуоресцентных белков (392) и токсинов, а также модификация последних не только с *N*-, но и с *C*-конца, дает возможность создавать новейшие биомолекулярные инструменты с требуемыми свойствами.

ВЫВОДЫ

- 1) Создана специализированная база данных токсинов скорпионов, действующих на K^+ каналы – Kalium, в которой собрана информация обо всех известных КТх. Произведена актуализация классификации этих токсинов.
- 2) С помощью комбинации транскриптомных и протеомных подходов в яде скорпионов *M. eurus* и *O. scrobiculosus* было обнаружено 10 блокаторов K^+ каналов, 6 из них – впервые.
- 3) Проведен анализ многообразия КТх в яде скорпионов *M. eurus* и *O. scrobiculosus*, а также дана физиологическая характеристика новым токсинам.
- 4) Получен химерный белок eGFP-OSK1, состоящий из КТх (OSK1) и флуоресцентного белка (eGFP). eGFP-OSK1 был использован для поиска новых лигандов K^+ каналов, для визуализации K_v на срезах мозжечка крысы и на поверхности клеток, а также для детекции изменения количества ионных каналов при развитии заболевания.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность:

- Научному руководителю А.А. Василевскому (группа молекулярных инструментов для нейробиологии) за огромный вклад в диссертационную работу: начиная с идейного вдохновения, заканчивая публикацией полученных результатов.
- Всему коллективу отдела молекулярной нейробиологии ИБХ РАН и лично Е.В. Гришину за важные стратегические указания и ценные советы, А.С. Никольскому за помощь в освоении большинства методов, А.А. Беркут, П.Б. Опарину и М.Ю. Сачковой за методологические указания и ценные рекомендации, А.А. Арзамасову и И.С. Чудецкому за помощь в наработке биологического материала, С.А. Козлову, Я.А. Андрееву, Д.И. Осмакову за техническую поддержку и ценные методические указания, Е.А. Рогожину за помощь в секвенировании полипептидов, А.Н. Микову за техническую поддержку и Ю.В. Корольковой за предоставление плазмидных векторов;
- Коллективу лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН и лично А.В. Феофанову и К.С. Кудряшевой за проведение экспериментов с использованием флуоресцентной системы детекции на основе сферопластов;
- Коллективу лаборатории лиганд-рецепторных взаимодействий ИБХ РАН, а именно: И.В. Шелухиной за проведение цитохимических экспериментов;
- Коллективу лаборатории моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН и лично Н.А. Крылову и А.О. Чугунову за компьютерное программирование и создание интерфейса базы данных Kalium;
- О.В. Некрасовой (группа нанобиоинженерии ИБХ РАН) за разработку флуоресцентной системы детекции на основе сферопластов;
- Коллективу лаборатории биокатализа ИБХ РАН и лично А.В. Степанову за помощь в дизайне плазмидных векторов, а также А.А. Белогурову, Я.А. Ломакину и Е.С. Кузиной за проведение экспериментов по фенотипическому анализу Т-лимфоцитов;
- М.Е. Матлашеву и Д.В. Игнатову (отдел геномики и постгеномных технологий ИБХ РАН) за предоставление компетентных клеток;
- А.М. Нестеренко (отдел научной информации НИИ ФХБ) за помощь в составлении регулярных выражений;
- Н.С. Бондаренко (лаборатория гормональных регуляций ИБР РАН) за предоставление гистологических срезов;
- Коллективу лаборатории токсикологии университета г. Лёвен, Бельгия, а именно: С. Пеньёру и Я. Титгату за проведение электрофизиологических экспериментов;

- Всему преподавательскому составу Брянского городского лицея № 1 им. А.С. Пушкина и лично О.А. Сосновской и А.М. Геращенко за их образовательную работу на высшем уровне;
- Преподавателям МГУ им. М.В. Ломоносова и УНЦ ИБХ РАН за профессиональную ориентацию и интересную образовательную программу;
- Моим родителям, брату и друзьям, которые оказывали неоценимую поддержку на протяжении всего проекта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. González, C., Baez-Nieto, D., Valencia, I., Oyarzún, I., Rojas, P., Naranjo, D., and Latorre, R. (2012) K(+) channels: function-structural overview. *Compr. Physiol.* **2**, 2087–149
2. Kubo, Y., Adelman, J. P., Clapham, D. E., Jan, L. Y., Karschin, A., Kurachi, Y., Lazdunski, M., Nichols, C. G., Seino, S., and Vandenberg, C. A. (2005) International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol. Rev.* **57**, 509–26
3. Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., and Kurachi, Y. (2010) Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol. Rev.* **90**, 291–366
4. Goldstein, S. A. N., Bayliss, D. A., Kim, D., Lesage, F., Plant, L. D., and Rajan, S. (2005) International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. *Pharmacol. Rev.* **57**, 527–40
5. Plant, L. D., Rajan, S., and Goldstein, S. A. N. (2005) K2P channels and their protein partners. *Curr. Opin. Neurobiol.* **15**, 326–33
6. Gutman, G. A., Chandy, K. G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L. A., Robertson, G. A., Rudy, B., Sanguinetti, M. C., Stühmer, W., and Wang, X. (2005) International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol. Rev.* **57**, 473–508
7. Wei, A. D., Gutman, G. A., Aldrich, R., Chandy, K. G., Grissmer, S., and Wulff, H. (2005) International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol. Rev.* **57**, 463–72
8. Köhler, M., Hirschberg, B., Bond, C. T., Kinzie, J. M., Marrion, N. V, Maylie, J., and Adelman, J. P. (1996) Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science* **273**, 1709–14
9. Salkoff, L., Butler, A., Ferreira, G., Santi, C., and Wei, A. (2006) High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 921–31
10. Wang, Y., and Wu, W.-H. (2013) Potassium transport and signaling in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **64**, 451–76
11. Gambale, F., and Uozumi, N. (2006) Properties of Shaker-type Potassium Channels in Higher Plants. *J. Membr. Biol.* **210**, 1–19
12. Hedrich, R. (2012) Ion channels in plants. *Physiol. Rev.* **92**, 1777–811
13. Kang, M., Moroni, A., Gazzarrini, S., DiFrancesco, D., Thiel, G., Severino, M., and Van Etten, J. L. (2004) Small potassium ion channel proteins encoded by chlorella viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 5318–24

14. Loukin, S. H., Kuo, M. M.-C., Zhou, X.-L., Haynes, W. J., Kung, C., and Saimi, Y. (2005) Microbial K⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* **125**, 521–7
15. Ketchum, K. A., Joiner, W. J., Sellers, A. J., Kaczmarek, L. K., and Goldstein, S. A. (1995) A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* **376**, 690–5
16. Hibino, H., Nin, F., Tsuzuki, C., and Kurachi, Y. (2010) How is the highly positive endocochlear potential formed? The specific architecture of the stria vascularis and the roles of the ion-transport apparatus. *Pflugers Arch.* **459**, 521–33
17. Fang, Y., Schram, G., Romanenko, V. G., Shi, C., Conti, L., Vandenberg, C. A., Davies, P. F., Nattel, S., and Levitan, I. (2005) Functional expression of Kir2.x in human aortic endothelial cells: the dominant role of Kir2.2. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **289**, C1134–44
18. Day, M., Carr, D. B., Ulrich, S., Ilijic, E., Tkatch, T., and Surmeier, D. J. (2005) Dendritic excitability of mouse frontal cortex pyramidal neurons is shaped by the interaction among HCN, Kir2, and K_{leak} channels. *J. Neurosci.* **25**, 8776–87
19. Mi, H., Deerinck, T. J., Jones, M., Ellisman, M. H., and Schwarz, T. L. (1996) Inwardly rectifying K⁺ channels that may participate in K⁺ buffering are localized in microvilli of Schwann cells. *J. Neurosci.* **16**, 2421–9
20. Kurachi, Y., Nakajima, T., and Sugimoto, T. (1986) On the mechanism of activation of muscarinic K⁺ channels by adenosine in isolated atrial cells: involvement of GTP-binding proteins. *Pflugers Arch.* **407**, 264–74
21. Jelacic, T. M., Kennedy, M. E., Wickman, K., and Clapham, D. E. (2000) Functional and biochemical evidence for G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ (GIRK) channels composed of GIRK2 and GIRK3. *J. Biol. Chem.* **275**, 36211–6
22. Krapivinsky, G., Gordon, E. A., Wickman, K., Velimirović, B., Krapivinsky, L., and Clapham, D. E. (1995) The G-protein-gated atrial K⁺ channel IKACH is a heteromultimer of two inwardly rectifying K⁽⁺⁾-channel proteins. *Nature* **374**, 135–41
23. Logothetis, D. E., Kurachi, Y., Galper, J., Neer, E. J., and Clapham, D. E. (1987) The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature* **325**, 321–6
24. Wickman, K., and Clapham, D. E. (1995) Ion channel regulation by G proteins. *Physiol. Rev.* **75**, 865–85
25. Kobrinsky, E., Mirshahi, T., Zhang, H., Jin, T., and Logothetis, D. E. (2000) Receptor-mediated hydrolysis of plasma membrane messenger PIP₂ leads to K⁺-current desensitization. *Nat. Cell Biol.* **2**, 507–14
26. Anumonwo, J. M. B., and Lopatin, A. N. (2010) Cardiac strong inward rectifier potassium channels. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **48**, 45–54

27. Iwanir, S., and Reuveny, E. (2008) Adrenaline-induced hyperpolarization of mouse pancreatic islet cells is mediated by G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels. *Pflugers Arch.* **456**, 1097–108
28. Signorini, S., Liao, Y. J., Duncan, S. A., Jan, L. Y., and Stoffel, M. (1997) Normal cerebellar development but susceptibility to seizures in mice lacking G protein-coupled, inwardly rectifying K⁺ channel GIRK2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 923–7
29. Fernández-Alacid, L., Aguado, C., Ciruela, F., Martín, R., Colón, J., Cabañero, M. J., Gassmann, M., Watanabe, M., Shigemoto, R., Wickman, K., Bettler, B., Sánchez-Prieto, J., and Luján, R. (2009) Subcellular compartment-specific molecular diversity of pre- and post-synaptic GABA-activated GIRK channels in Purkinje cells. *J. Neurochem.* **110**, 1363–76
30. Noma, A. (1983) ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature* **305**, 147–8
31. Clement, J. P., Kunjilwar, K., Gonzalez, G., Schwanstecher, M., Panten, U., Aguilar-Bryan, L., and Bryan, J. (1997) Association and stoichiometry of K(ATP) channel subunits. *Neuron* **18**, 827–38
32. Ashcroft, F. M., and Rorsman, P. (1989) Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **54**, 87–143
33. Hebert, S. C., Desir, G., Giebisch, G., and Wang, W. (2005) Molecular diversity and regulation of renal potassium channels. *Physiol. Rev.* **85**, 319–71
34. Hibino, H., Fujita, A., Iwai, K., Yamada, M., and Kurachi, Y. (2004) Differential assembly of inwardly rectifying K⁺ channel subunits, Kir4.1 and Kir5.1, in brain astrocytes. *J. Biol. Chem.* **279**, 44065–73
35. Neusch, C., Papadopoulos, N., Müller, M., Maletzki, I., Winter, S. M., Hirrlinger, J., Handschuh, M., Bähr, M., Richter, D. W., Kirchhoff, F., and Hülsmann, S. (2006) Lack of the Kir4.1 channel subunit abolishes K⁺ buffering properties of astrocytes in the ventral respiratory group: impact on extracellular K⁺ regulation. *J. Neurophysiol.* **95**, 1843–52
36. Goldstein, S. A., Price, L. A., Rosenthal, D. N., and Pausch, M. H. (1996) ORK1, a potassium-selective leak channel with two pore domains cloned from *Drosophila melanogaster* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 13256–61
37. Talley, E. M., Solorzano, G., Lei, Q., Kim, D., and Bayliss, D. A. (2001) Cns distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *J. Neurosci.* **21**, 7491–505
38. Enyedi, P., and Czirják, G. (2010) Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol. Rev.* **90**, 559–605
39. Honoré, E. (2007) The neuronal background K₂P channels: focus on TREK1. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 251–61
40. Bayliss, D. A., and Barrett, P. Q. (2008) Emerging roles for two-pore-domain potassium channels and their potential therapeutic impact. *Trends Pharmacol. Sci.* **29**, 566–75

41. Lesage, F., Reyes, R., Fink, M., Duprat, F., Guillemare, E., and Lazdunski, M. (1996) Dimerization of TWIK-1 K⁺ channel subunits via a disulfide bridge. *EMBO J.* **15**, 6400–7
42. Lesage, F., and Lazdunski, M. (2000) Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **279**, F793–801
43. Kim, D., Fujita, A., Horio, Y., and Kurachi, Y. (1998) Cloning and functional expression of a novel cardiac two-pore background K⁺ channel (cTBAK-1). *Circ. Res.* **82**, 513–8
44. Hervieu, G. J., Cluderay, J. E., Gray, C. W., Green, P. J., Ranson, J. L., Randall, A. D., and Meadows, H. J. (2001) Distribution and expression of TREK-1, a two-pore-domain potassium channel, in the adult rat CNS. *Neuroscience* **103**, 899–919
45. Medhurst, A. D., Rennie, G., Chapman, C. G., Meadows, H., Duckworth, M. D., Kelsell, R. E., Gloger, I. I., and Pangalos, M. N. (2001) Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **86**, 101–14
46. Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**, 69–77
47. Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (2003) X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* **423**, 33–41
48. Long, S. B., Campbell, E. B., and Mackinnon, R. (2005) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* **309**, 897–903
49. Long, S. B., Tao, X., Campbell, E. B., and MacKinnon, R. (2007) Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* **450**, 376–82
50. Grissmer, S., Nguyen, A. N., Aiyar, J., Hanson, D. C., Mather, R. J., Gutman, G. A., Karmilowicz, M. J., Auperin, D. D., and Chandy, K. G. (1994) Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K⁺ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol. Pharmacol.* **45**, 1227–34
51. Hess, P., and Tsien, R. W. (1984) Mechanism of ion permeation through calcium channels. *Nature* **309**, 453–6
52. Salkoff, L., Wei, A. D., Baban, B., Butler, A., Fawcett, G., Ferreira, G., and Santi, C. M. (2005) Potassium channels in *C. elegans*. *WormBook*, 1–15
53. Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., and MacKinnon, R. (1994) Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys. J.* **66**, 1061–7
54. Bezanilla, F., and Armstrong, C. M. (1972) Negative conductance caused by entry of sodium and cesium ions into the potassium channels of squid axons. *J. Gen. Physiol.* **60**, 588–608
55. Hodgkin, A. L., and Keynes, R. D. (1955) The potassium permeability of a giant nerve fibre. *J. Physiol.* **128**, 61–88

56. MacKinnon, R. (2003) Potassium channels. *FEBS Lett.* **555**, 62–5
57. Aggarwal, S. K., and MacKinnon, R. (1996) Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K⁺ channel. *Neuron* **16**, 1169–77
58. Lu, Z., Klem, A. M., and Ramu, Y. (2001) Ion conduction pore is conserved among potassium channels. *Nature* **413**, 809–13
59. Lu, Z., Klem, A. M., and Ramu, Y. (2002) Coupling between voltage sensors and activation gate in voltage-gated K⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* **120**, 663–76
60. Barros, F., Domínguez, P., and de la Peña, P. (2012) Cytoplasmic domains and voltage-dependent potassium channel gating. *Front. Pharmacol.* **3**, 49
61. Sigworth, F. J. (1994) Voltage gating of ion channels. *Q. Rev. Biophys.* **27**, 1–40
62. Bezanilla, F. (2000) The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol. Rev.* **80**, 555–92
63. Mannuzzu, L. M., Moronne, M. M., and Isacoff, E. Y. (1996) Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating. *Science* **271**, 213–6
64. Schoppa, N. E., McCormack, K., Tanouye, M. A., and Sigworth, F. J. (1992) The size of gating charge in wild-type and mutant Shaker potassium channels. *Science* **255**, 1712–5
65. Zagotta, W. N., Hoshi, T., and Aldrich, R. W. (1994) Shaker potassium channel gating. III: Evaluation of kinetic models for activation. *J. Gen. Physiol.* **103**, 321–62
66. Demo, S. D., and Yellen, G. (1991) The inactivation gate of the Shaker K⁺ channel behaves like an open-channel blocker. *Neuron* **7**, 743–53
67. Armstrong, C. M., and Bezanilla, F. (1977) Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J. Gen. Physiol.* **70**, 567–90
68. Zagotta, W. N., Hoshi, T., and Aldrich, R. W. (1990) Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science* **250**, 568–71
69. Hoshi, T., Zagotta, W. N., and Aldrich, R. W. (1990) Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* **250**, 533–8
70. Oliva, C., González, V., and Naranjo, D. (2005) Slow inactivation in voltage gated potassium channels is insensitive to the binding of pore occluding peptide toxins. *Biophys. J.* **89**, 1009–19
71. Hoshi, T., Zagotta, W. N., and Aldrich, R. W. (1991) Two types of inactivation in Shaker K⁺ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron* **7**, 547–56
72. Choi, K. L., Aldrich, R. W., and Yellen, G. (1991) Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 5092–5

73. Rettig, J., Heinemann, S. H., Wunder, F., Lorra, C., Parcej, D. N., Dolly, J. O., and Pongs, O. (1994) Inactivation properties of voltage-gated K⁺ channels altered by presence of beta-subunit. *Nature* **369**, 289–94
74. Yusaf, S. P., Wray, D., and Sivaprasadarao, A. (1996) Measurement of the movement of the S4 segment during the activation of a voltage-gated potassium channel. *Pflugers Arch.* **433**, 91–7
75. Jerng, H. H., Pfaffinger, P. J., and Covarrubias, M. (2004) Molecular physiology and modulation of somatodendritic A-type potassium channels. *Mol. Cell. Neurosci.* **27**, 343–69
76. Gubitosi-Klug, R. A., Mancuso, D. J., and Gross, R. W. (2005) The human Kv1.1 channel is palmitoylated, modulating voltage sensing: Identification of a palmitoylation consensus sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 5964–8
77. Henke, G., Maier, G., Wallisch, S., Boehmer, C., and Lang, F. (2004) Regulation of the voltage gated K⁺ channel Kv1.3 by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the serum and glucocorticoid inducible kinase SGK1. *J. Cell. Physiol.* **199**, 194–9
78. Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F. (1952) Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. *J. Physiol.* **116**, 449–72
79. Heinemann, S. H., Rettig, J., Graack, H. R., and Pongs, O. (1996) Functional characterization of Kv channel beta-subunits from rat brain. *J. Physiol.* **493 (Pt 3)**, 625–33
80. Lai, H. C., and Jan, L. Y. (2006) The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 548–62
81. Beckh, S., and Pongs, O. (1990) Members of the RCK potassium channel family are differentially expressed in the rat nervous system. *EMBO J.* **9**, 777–82
82. Vacher, H., Mohapatra, D. P., and Trimmer, J. S. (2008) Localization and targeting of voltage-dependent ion channels in mammalian central neurons. *Physiol. Rev.* **88**, 1407–47
83. Rangaraju, S., Chi, V., Pennington, M. W., and Chandy, K. G. (2009) Kv1.3 potassium channels as a therapeutic target in multiple sclerosis. *Expert Opin. Ther. Targets* **13**, 909–24
84. Mays, D. J., Foose, J. M., Philipson, L. H., and Tamkun, M. M. (1995) Localization of the Kv1.5 K⁺ channel protein in explanted cardiac tissue. *J. Clin. Invest.* **96**, 282–92
85. Mohapatra, D. P., Park, K.-S., and Trimmer, J. S. (2007) Dynamic regulation of the voltage-gated Kv2.1 potassium channel by multisite phosphorylation. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 1064–8
86. Hermansteyne, T. O., Kihira, Y., Misono, K., Deitchler, A., Yanagawa, Y., and Misonou, H. (2010) Immunolocalization of the voltage-gated potassium channel Kv2.2 in GABAergic neurons in the basal forebrain of rats and mice. *J. Comp. Neurol.* **518**, 4298–310

87. Malin, S. A., and Nerbonne, J. M. (2002) Delayed rectifier K⁺ currents, IK, are encoded by Kv2 alpha-subunits and regulate tonic firing in mammalian sympathetic neurons. *J. Neurosci.* **22**, 10094–105
88. Swartz, K. J., and MacKinnon, R. (1995) An inhibitor of the Kv2.1 potassium channel isolated from the venom of a Chilean tarantula. *Neuron* **15**, 941–9
89. Grissmer, S., Ghanshani, S., Dethlefs, B., McPherson, J. D., Wasmuth, J. J., Gutman, G. A., Cahalan, M. D., and Chandy, K. G. (1992) The Shaw-related potassium channel gene, Kv3.1, on human chromosome 11, encodes the type I K⁺ channel in T cells. *J. Biol. Chem.* **267**, 20971–9
90. Yan, L., Herrington, J., Goldberg, E., Dulski, P. M., Bugianesi, R. M., Slaughter, R. S., Banerjee, P., Brochu, R. M., Priest, B. T., Kaczorowski, G. J., Rudy, B., and Garcia, M. L. (2005) Stichodactyla helianthus peptide, a pharmacological tool for studying Kv3.2 channels. *Mol. Pharmacol.* **67**, 1513–21
91. Cooper, E. C., Aldape, K. D., Abosch, A., Barbaro, N. M., Berger, M. S., Peacock, W. S., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (2000) Colocalization and coassembly of two human brain M-type potassium channel subunits that are mutated in epilepsy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 4914–9
92. Wymore, R. S., Korenberg, J. R., Kinoshita, K. D., Aiyar, J., Coyne, C., Chen, X. N., Hustad, C. M., Copeland, N. G., Gutman, G. A., and Jenkins, N. A. (1994) Genomic organization, nucleotide sequence, biophysical properties, and localization of the voltage-gated K⁺ channel gene KCNA4/Kv1.4 to mouse chromosome 2/human 11p14 and mapping of KCNC1/Kv3.1 to mouse 7/human 11p14.3-p15.2 and KCNA1/Kv1.1 to human 12p13. *Genomics* **20**, 191–202
93. Ghanshani, S., Pak, M., McPherson, J. D., Strong, M., Dethlefs, B., Wasmuth, J. J., Salkoff, L., Gutman, G. A., and Chandy, K. G. (1992) Genomic organization, nucleotide sequence, and cellular distribution of a Shaw-related potassium channel gene, Kv3.3, and mapping of Kv3.3 and Kv3.4 to human chromosomes 19 and 1. *Genomics* **12**, 190–6
94. Isbrandt, D., Leicher, T., Waldschütz, R., Zhu, X., Luhmann, U., Michel, U., Sauter, K., and Pongs, O. (2000) Gene structures and expression profiles of three human KCND (Kv4) potassium channels mediating A-type currents I(TO) and I(SA). *Genomics* **64**, 144–54
95. Elkins, T., Ganetzky, B., and Wu, C. F. (1986) A *Drosophila* mutation that eliminates a calcium-dependent potassium current. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 8415–9
96. Saganich, M. J., Machado, E., and Rudy, B. (2001) Differential expression of genes encoding subthreshold-operating voltage-gated K⁺ channels in brain. *J. Neurosci.* **21**, 4609–24
97. Ludwig, J., Weseloh, R., Karschin, C., Liu, Q., Netzer, R., Engeland, B., Stansfeld, C., and Pongs, O. (2000) Cloning and functional expression of rat eag2, a new member of the ether-à-go-go family of potassium channels and comparison of its distribution with that of eag1. *Mol. Cell. Neurosci.* **16**, 59–70

98. Pardo, L. A., and Sühmer, W. (2008) Eag1 as a cancer target. *Expert Opin. Ther. Targets* **12**, 837–43
99. Shi, W., Wymore, R. S., Wang, H. S., Pan, Z., Cohen, I. S., McKinnon, D., and Dixon, J. E. (1997) Identification of two nervous system-specific members of the erg potassium channel gene family. *J. Neurosci.* **17**, 9423–32
100. Kang, J., Chen, X. L., and Rampe, D. (2001) The antipsychotic drugs sertindole and pimozide block erg3, a human brain K(+) channel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**, 499–504
101. Diness, T. G., Yeh, Y.-H., Qi, X. Y., Chartier, D., Tsuji, Y., Hansen, R. S., Olesen, S.-P., Grunnet, M., and Nattel, S. (2008) Antiarrhythmic properties of a rapid delayed-rectifier current activator in rabbit models of acquired long QT syndrome. *Cardiovasc. Res.* **79**, 61–9
102. Larsen, A. P., Bentzen, B. H., and Grunnet, M. (2010) Differential effects of Kv11.1 activators on Kv11.1a, Kv11.1b and Kv11.1a/Kv11.1b channels. *Br. J. Pharmacol.* **161**, 614–28
103. Zou, A., Lin, Z., Humble, M., Creech, C. D., Wagoner, P. K., Krafte, D., Jegla, T. J., and Wickenden, A. D. (2003) Distribution and functional properties of human KCNH8 (Elk1) potassium channels. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **285**, C1356–66
104. Engeland, B., Neu, A., Ludwig, J., Roeper, J., and Pongs, O. (1998) Cloning and functional expression of rat ether-à-go-go-like K⁺ channel genes. *J. Physiol.* **513** (Pt 3, 647–54
105. Kramer, J. W., Post, M. A., Brown, A. M., and Kirsch, G. E. (1998) Modulation of potassium channel gating by coexpression of Kv2.1 with regulatory Kv5.1 or Kv6.1 alpha-subunits. *Am. J. Physiol.* **274**, C1501–10
106. Salinas, M., de Weille, J., Guillemare, E., Lazdunski, M., and Hugnot, J. P. (1997) Modes of regulation of shab K⁺ channel activity by the Kv8.1 subunit. *J. Biol. Chem.* **272**, 8774–80
107. Richardson, F. C., and Kaczmarek, L. K. (2000) Modification of delayed rectifier potassium currents by the Kv9.1 potassium channel subunit. *Hear. Res.* **147**, 21–30
108. Blatz, A. L., and Magleby, K. L. (1986) Single apamin-blocked Ca-activated K⁺ channels of small conductance in cultured rat skeletal muscle. *Nature* **323**, 718–20
109. Park, Y. B. (1994) Ion selectivity and gating of small conductance Ca(2+)-activated K⁺ channels in cultured rat adrenal chromaffin cells. *J. Physiol.* **481** (Pt 3, 555–70
110. Zhang, B. M., Kohli, V., Adachi, R., López, J. A., Udden, M. M., and Sullivan, R. (2001) Calmodulin binding to the C-terminus of the small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel hSK1 is affected by alternative splicing. *Biochemistry* **40**, 3189–95
111. Barmeyer, C., Rahner, C., Yang, Y., Sigworth, F. J., Binder, H. J., and Rajendran, V. M. (2010) Cloning and identification of tissue-specific expression of KCNN4 splice variants in rat colon. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **299**, C251–63

112. Stocker, M., and Pedarzani, P. (2000) Differential distribution of three Ca(2+)-activated K(+) channel subunits, SK1, SK2, and SK3, in the adult rat central nervous system. *Mol. Cell. Neurosci.* **15**, 476–93
113. Pedarzani, P., Kulik, A., Muller, M., Ballanyi, K., and Stocker, M. (2000) Molecular determinants of Ca²⁺-dependent K⁺ channel function in rat dorsal vagal neurones. *J. Physiol.* **527 Pt 2**, 283–90
114. Strassmaier, T., Bond, C. T., Sailer, C. A., Knaus, H.-G., Maylie, J., and Adelman, J. P. (2005) A novel isoform of SK2 assembles with other SK subunits in mouse brain. *J. Biol. Chem.* **280**, 21231–6
115. Maylie, J., Bond, C. T., Herson, P. S., Lee, W.-S., and Adelman, J. P. (2004) Small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels and calmodulin. *J. Physiol.* **554**, 255–61
116. Ishii, T. M., Maylie, J., and Adelman, J. P. (1997) Determinants of apamin and d-tubocurarine block in SK potassium channels. *J. Biol. Chem.* **272**, 23195–200
117. Castle, N. A., and Strong, P. N. (1986) Identification of two toxins from scorpion (*Leiurus quinquestriatus*) venom which block distinct classes of calcium-activated potassium channel. *FEBS Lett.* **209**, 117–21
118. Adelman, J. P., Shen, K. Z., Kavanaugh, M. P., Warren, R. A., Wu, Y. N., Lagrutta, A., Bond, C. T., and North, R. A. (1992) Calcium-activated potassium channels expressed from cloned complementary DNAs. *Neuron* **9**, 209–16
119. Atkinson, N. S., Robertson, G. A., and Ganetzky, B. (1991) A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila slo* locus. *Science* **253**, 551–5
120. Wei, A., Solaro, C., Lingle, C., and Salkoff, L. (1994) Calcium sensitivity of BK-type KCa channels determined by a separable domain. *Neuron* **13**, 671–81
121. Bhattacharjee, A., Joiner, W. J., Wu, M., Yang, Y., Sigworth, F. J., and Kaczmarek, L. K. (2003) Slick (Slo2.1), a rapidly-gating sodium-activated potassium channel inhibited by ATP. *J. Neurosci.* **23**, 11681–91
122. Yuan, A., Dourado, M., Butler, A., Walton, N., Wei, A., and Salkoff, L. (2000) SLO-2, a K⁺ channel with an unusual Cl⁻ dependence. *Nat. Neurosci.* **3**, 771–9
123. Schreiber, M., Wei, A., Yuan, A., Gaut, J., Saito, M., and Salkoff, L. (1998) Slo3, a novel pH-sensitive K⁺ channel from mammalian spermatocytes. *J. Biol. Chem.* **273**, 3509–16
124. Cui, J., and Aldrich, R. W. (2000) Allosteric linkage between voltage and Ca(2+)-dependent activation of BK-type mslo1 K(+) channels. *Biochemistry* **39**, 15612–9
125. Zhang, X., Zeng, X., and Lingle, C. J. (2006) Slo3 K⁺ channels: voltage and pH dependence of macroscopic currents. *J. Gen. Physiol.* **128**, 317–36
126. Schreiber, M., and Salkoff, L. (1997) A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophys. J.* **73**, 1355–63

127. Zhang, G., Huang, S.-Y., Yang, J., Shi, J., Yang, X., Moller, A., Zou, X., and Cui, J. (2010) Ion sensing in the RCK1 domain of BK channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 18700–5
128. Latorre, R., Vergara, C., and Hidalgo, C. (1982) Reconstitution in planar lipid bilayers of a Ca²⁺-dependent K⁺ channel from transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 805–9
129. Marty, A. (1981) Ca-dependent K channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. *Nature* **291**, 497–500
130. Pallotta, B. S., Magleby, K. L., and Barrett, J. N. (1981) Single channel recordings of Ca²⁺-activated K⁺ currents in rat muscle cell culture. *Nature* **293**, 471–4
131. Tseng-Crank, J., Foster, C. D., Krause, J. D., Mertz, R., Godinot, N., DiChiara, T. J., and Reinhart, P. H. (1994) Cloning, expression, and distribution of functionally distinct Ca(2+)-activated K⁺ channel isoforms from human brain. *Neuron* **13**, 1315–30
132. Langer, P., Gründer, S., and Rüsç, A. (2003) Expression of Ca²⁺-activated BK channel mRNA and its splice variants in the rat cochlea. *J. Comp. Neurol.* **455**, 198–209
133. Zarei, M. M., Zhu, N., Alioua, A., Eghbali, M., Stefani, E., and Toro, L. (2001) A novel MaxiK splice variant exhibits dominant-negative properties for surface expression. *J. Biol. Chem.* **276**, 16232–9
134. Xie, J., and McCobb, D. P. (1998) Control of alternative splicing of potassium channels by stress hormones. *Science* **280**, 443–6
135. Chen, L., Tian, L., MacDonald, S. H.-F., McClafferty, H., Hammond, M. S. L., Huibant, J.-M., Ruth, P., Knaus, H.-G., and Shipston, M. J. (2005) Functionally diverse complement of large conductance calcium- and voltage-activated potassium channel (BK) alpha-subunits generated from a single site of splicing. *J. Biol. Chem.* **280**, 33599–609
136. Shen, K. Z., Lagrutta, A., Davies, N. W., Standen, N. B., Adelman, J. P., and North, R. A. (1994) Tetraethylammonium block of Slowpoke calcium-activated potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes: evidence for tetrameric channel formation. *Pflugers Arch.* **426**, 440–5
137. Miller, C., Moczydlowski, E., Latorre, R., and Phillips, M. (1985) Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca²⁺-activated K⁺ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature* **313**, 316–8
138. Candia, S., Garcia, M. L., and Latorre, R. (1992) Mode of action of iberiotoxin, a potent blocker of the large conductance Ca(2+)-activated K⁺ channel. *Biophys. J.* **63**, 583–90
139. Ledoux, J., Werner, M. E., Brayden, J. E., and Nelson, M. T. (2006) Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology (Bethesda)*. **21**, 69–78
140. Smith, P. A., Bokvist, K., Arkhammar, P., Berggren, P. O., and Rorsman, P. (1990) Delayed rectifying and calcium-activated K⁺ channels and their significance for action potential repolarization in mouse pancreatic beta-cells. *J. Gen. Physiol.* **95**, 1041–59

141. Sausbier, U., Sausbier, M., Sailer, C. A., Arntz, C., Knaus, H.-G., Neuhuber, W., and Ruth, P. (2006) Ca²⁺-activated K⁺ channels of the BK-type in the mouse brain. *Histochem. Cell Biol.* **125**, 725–41
142. Douglas, R. M., Lai, J. C. K., Bian, S., Cummins, L., Moczydlowski, E., and Haddad, G. G. (2006) The calcium-sensitive large-conductance potassium channel (BK/MAXI K) is present in the inner mitochondrial membrane of rat brain. *Neuroscience* **139**, 1249–61
143. Kameyama, M., Kakei, M., Sato, R., Shibasaki, T., Matsuda, H., and Irisawa, H. (1984) Intracellular Na⁺ activates a K⁺ channel in mammalian cardiac cells. *Nature* **309**, 354–6
144. Dryer, S. E. (1994) Na(+)-activated K⁺ channels: a new family of large-conductance ion channels. *Trends Neurosci.* **17**, 155–60
145. Yuan, A., Santi, C. M., Wei, A., Wang, Z. W., Pollak, K., Nonet, M., Kaczmarek, L., Crowder, C. M., and Salkoff, L. (2003) The sodium-activated potassium channel is encoded by a member of the Slo gene family. *Neuron* **37**, 765–73
146. Chen, H., Kronengold, J., Yan, Y., Gazula, V.-R., Brown, M. R., Ma, L., Ferreira, G., Yang, Y., Bhattacharjee, A., Sigworth, F. J., Salkoff, L., and Kaczmarek, L. K. (2009) The N-terminal domain of Slack determines the formation and trafficking of Slick/Slack heteromeric sodium-activated potassium channels. *J. Neurosci.* **29**, 5654–65
147. Brown, M. R., Kronengold, J., Gazula, V.-R., Spilianakis, C. G., Flavell, R. A., von Hehn, C. A. A., Bhattacharjee, A., and Kaczmarek, L. K. (2008) Amino-terminal isoforms of the Slack K⁺ channel, regulated by alternative promoters, differentially modulate rhythmic firing and adaptation. *J. Physiol.* **586**, 5161–79
148. Bhattacharjee, A., Gan, L., and Kaczmarek, L. K. (2002) Localization of the Slack potassium channel in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* **454**, 241–54
149. Hess, D., Nanou, E., and El Manira, A. (2007) Characterization of Na⁺-activated K⁺ currents in larval lamprey spinal cord neurons. *J. Neurophysiol.* **97**, 3484–93
150. Santi, C. M., Butler, A., Kuhn, J., Wei, A., and Salkoff, L. (2009) Bovine and mouse SLO3 K⁺ channels: evolutionary divergence points to an RCK1 region of critical function. *J. Biol. Chem.* **284**, 21589–98
151. Tang, Q.-Y., Zhang, Z., Xia, X.-M., and Lingle, C. J. (2010) Block of mouse Slo1 and Slo3 K⁺ channels by CTX, IbTX, TEA, 4-AP and quinidine. *Channels (Austin)*. **4**, 22–41
152. Pongs, O., Leicher, T., Berger, M., Roeper, J., Bähring, R., Wray, D., Giese, K. P., Silva, A. J., and Storm, J. F. (1999) Functional and molecular aspects of voltage-gated K⁺ channel beta subunits. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **868**, 344–55
153. Boland, L. M., Jiang, M., Lee, S. Y., Fahrenkrug, S. C., Harnett, M. T., and O’Grady, S. M. (2003) Functional properties of a brain-specific NH₂-terminally spliced modulator of Kv4 channels. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **285**, C161–70
154. Nadal, M. S., Ozaita, A., Amarillo, Y., Vega-Saenz de Miera, E., Ma, Y., Mo, W., Goldberg, E. M., Misumi, Y., Ikehara, Y., Neubert, T. A., and Rudy, B. (2003) The

- CD26-related dipeptidyl aminopeptidase-like protein DPPX is a critical component of neuronal A-type K⁺ channels. *Neuron* **37**, 449–61
155. Shibata, R., Misonou, H., Campomanes, C. R., Anderson, A. E., Schrader, L. A., Doliveira, L. C., Carroll, K. I., Sweatt, J. D., Rhodes, K. J., and Trimmer, J. S. (2003) A fundamental role for KChIPs in determining the molecular properties and trafficking of Kv4.2 potassium channels. *J. Biol. Chem.* **278**, 36445–54
 156. Li, Y., Um, S. Y., and McDonald, T. V (2006) Voltage-gated potassium channels: regulation by accessory subunits. *Neuroscientist* **12**, 199–210
 157. Weng, J., Cao, Y., Moss, N., and Zhou, M. (2006) Modulation of voltage-dependent Shaker family potassium channels by an aldo-keto reductase. *J. Biol. Chem.* **281**, 15194–200
 158. Orio, P., Rojas, P., Ferreira, G., and Latorre, R. (2002) New disguises for an old channel: MaxiK channel beta-subunits. *News Physiol. Sci.* **17**, 156–61
 159. Xia, X.-M., Ding, J. P., and Lingle, C. J. (2003) Inactivation of BK channels by the NH₂ terminus of the beta2 auxiliary subunit: an essential role of a terminal peptide segment of three hydrophobic residues. *J. Gen. Physiol.* **121**, 125–48
 160. Zeng, X.-H., Xia, X.-M., and Lingle, C. J. (2003) Redox-sensitive extracellular gates formed by auxiliary beta subunits of calcium-activated potassium channels. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 448–54
 161. Ha, T. S., Heo, M.-S., and Park, C.-S. (2004) Functional effects of auxiliary beta4-subunit on rat large-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel. *Biophys. J.* **86**, 2871–82
 162. Hagiwara, S., Miyazaki, S., and Rosenthal, N. P. (1976) Potassium current and the effect of cesium on this current during anomalous rectification of the egg cell membrane of a starfish. *J. Gen. Physiol.* **67**, 621–38
 163. Robertson, D. W., and Steinberg, M. I. (1990) Potassium channel modulators: scientific applications and therapeutic promise. *J. Med. Chem.* **33**, 1529–41
 164. Moczydlowski, E., Lucchesi, K., and Ravindran, A. (1988) An emerging pharmacology of peptide toxins targeted against potassium channels. *J. Membr. Biol.* **105**, 95–111
 165. MacKinnon, R., and Miller, C. (1989) Mutant potassium channels with altered binding of charybdotoxin, a pore-blocking peptide inhibitor. *Science* **245**, 1382–5
 166. Swartz, K. J. (2007) Tarantula toxins interacting with voltage sensors in potassium channels. *Toxicon* **49**, 213–30
 167. Swartz, K. J., and MacKinnon, R. (1997) Hanatoxin modifies the gating of a voltage-dependent K⁺ channel through multiple binding sites. *Neuron* **18**, 665–73
 168. Gómez-Varela, D., Zwick-Wallasch, E., Knötgen, H., Sánchez, A., Hettmann, T., Ossipov, D., Weseloh, R., Contreras-Jurado, C., Rothe, M., Stühmer, W., and Pardo, L. A. (2007) Monoclonal antibody blockade of the human Eag1 potassium channel function exerts antitumor activity. *Cancer Res.* **67**, 7343–9

169. Chhabra, S., Chang, S. C., Nguyen, H. M., Huq, R., Tanner, M. R., Londono, L. M., Estrada, R., Dhawan, V., Chauhan, S., Upadhyay, S. K., Gindin, M., Hotez, P. J., Valenzuela, J. G., Mohanty, B., Swarbrick, J. D., Wulff, H., Iadonato, S. P., Gutman, G. A., Beeton, C., Pennington, M. W., Norton, R. S., and Chandy, K. G. (2014) Kv1.3 channel-blocking immunomodulatory peptides from parasitic worms: implications for autoimmune diseases. *FASEB J.*
170. Xiang, F., Xie, Z., Feng, J., Yang, W., Cao, Z., Li, W., Chen, Z., and Wu, Y. (2015) Plectasin, first animal toxin-like fungal defensin blocking potassium channels through recognizing channel pore region. *Toxins (Basel)*. **7**, 34–42
171. Yang, W., Feng, J., Xiang, F., Xie, Z., Zhang, G., Sabatier, J.-M., Cao, Z., Li, W., Chen, Z., and Wu, Y. (2015) Endogenous animal toxin-like human β -defensin 2 inhibits own K(+) channels through interaction with channel extracellular pore region. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 845–53
172. Wulff, H., Castle, N. A., and Pardo, L. A. (2009) Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 982–1001
173. Hermann, A., and Gorman, A. L. (1979) Blockade of voltage-dependent and Ca²⁺-dependent K⁺ current components by internal Ba²⁺ in molluscan pacemaker neurons. *Experientia* **35**, 229–31
174. Wulff, H., and Zhorov, B. S. (2008) K⁺ channel modulators for the treatment of neurological disorders and autoimmune diseases. *Chem. Rev.* **108**, 1744–73
175. Zheng, W., and Zhang, Y. P. (1986) Research progress on a new potassium channel-blocking agent-4-aminopyridine. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* **17**, 254–8
176. Illes, P., Nörenberg, W., and Gebicke-Haerter, P. J. (1996) Molecular mechanisms of microglial activation. B. Voltage- and purinoceptor-operated channels in microglia. *Neurochem. Int.* **29**, 13–24
177. Brown, D. A., and Selyanko, A. A. (1985) Membrane currents underlying the cholinergic slow excitatory post-synaptic potential in the rat sympathetic ganglion. *J. Physiol.* **365**, 365–87
178. DeCoursey, T. E., Chandy, K. G., Gupta, S., and Cahalan, M. D. (1985) Voltage-dependent ion channels in T-lymphocytes. *J. Neuroimmunol.* **10**, 71–95
179. French, R. J., and Shoukimas, J. J. (1981) Blockage of squid axon potassium conductance by internal tetra-N-alkylammonium ions of various sizes. *Biophys. J.* **34**, 271–91
180. Faraldo-Gómez, J. D., Kutluay, E., Jogini, V., Zhao, Y., Heginbotham, L., and Roux, B. (2007) Mechanism of intracellular block of the KcsA K⁺ channel by tetrabutylammonium: insights from X-ray crystallography, electrophysiology and replica-exchange molecular dynamics simulations. *J. Mol. Biol.* **365**, 649–62
181. Armstrong, C. M., and Loboda, A. (2001) A model for 4-aminopyridine action on K channels: similarities to tetraethylammonium ion action. *Biophys. J.* **81**, 895–904

182. Del Camino, D., Kanevsky, M., and Yellen, G. (2005) Status of the intracellular gate in the activated-not-open state of shaker K⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* **126**, 419–28
183. Martin-Eauclaire, M. F., Céard, B., Ribeiro, A. M., Diniz, C. R., Rochat, H., and Bougis, P. E. (1992) Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding the main beta-neurotoxin from the venom of the South American scorpion *Tityus serrulatus*. *FEBS Lett.* **302**, 220–2
184. Vlasak, R., and Kreil, G. (1984) Nucleotide sequence of cloned cDNAs coding for preproscapin, a major product of queen-bee venom glands. *Eur. J. Biochem.* **145**, 279–82
185. Orlov, B. N., Egorov, V. V., Gelashvili, D. B., and Omarov, S. M. (1980) [Pharmacology of the venom from the scorpion, *Buthus eupeus*]. *Farmakol. Toksikol.* **43**, 730–3
186. Zhu, L., Peigneur, S., Gao, B., Tytgat, J., and Zhu, S. (2013) Two recombinant α -like scorpion toxins from *Mesobuthus eupeus* with differential affinity toward insect and mammalian Na⁽⁺⁾ channels. *Biochimie* **95**, 1732–40
187. Rodríguez de la Vega, R. C., Schwartz, E. F., and Possani, L. D. (2010) Mining on scorpion venom biodiversity. *Toxicon* **56**, 1155–61
188. Quintero-Hernández, V., Ortiz, E., Rendón-Anaya, M., Schwartz, E. F., Becerril, B., Corzo, G., and Possani, L. D. (2011) Scorpion and spider venom peptides: gene cloning and peptide expression. *Toxicon* **58**, 644–63
189. Ma, Y., He, Y., Zhao, R., Wu, Y., Li, W., and Cao, Z. (2012) Extreme diversity of scorpion venom peptides and proteins revealed by transcriptomic analysis: implication for proteome evolution of scorpion venom arsenal. *J. Proteomics* **75**, 1563–76
190. Cerni, F. A., Pucca, M. B., Peigneur, S., Cremonez, C. M., Bordon, K. C. F., Tytgat, J., and Arantes, E. C. (2014) Electrophysiological characterization of Ts6 and Ts7, K⁺ channel toxins isolated through an improved *Tityus serrulatus* venom purification procedure. *Toxins (Basel)*. **6**, 892–913
191. Shijin, Y., Hong, Y., Yibao, M., Zongyun, C., Han, S., Yingliang, W., Zhijian, C., and Wenxin, L. (2008) Characterization of a new Kv1.3 channel-specific blocker, J123, from the scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Peptides* **29**, 1514–20
192. Cao, Z., Yu, Y., Wu, Y., Hao, P., Di, Z., He, Y., Chen, Z., Yang, W., Shen, Z., He, X., Sheng, J., Xu, X., Pan, B., Feng, J., Yang, X., Hong, W., Zhao, W., Li, Z., Huang, K., Li, T., Kong, Y., Liu, H., Jiang, D., Zhang, B., Hu, J., Hu, Y., Wang, B., Dai, J., Yuan, B., Feng, Y., Huang, W., Xing, X., Zhao, G., Li, X., Li, Y., and Li, W. (2013) The genome of *Mesobuthus martensii* reveals a unique adaptation model of arthropods. *Nat. Commun.* **4**, 2602
193. Sanggaard, K. W., Bechsgaard, J. S., Fang, X., Duan, J., Dyrlund, T. F., Gupta, V., Jiang, X., Cheng, L., Fan, D., Feng, Y., Han, L., Huang, Z., Wu, Z., Liao, L., Settepani, V., Thøgersen, I. B., Vanthournout, B., Wang, T., Zhu, Y., Funch, P., Enghild, J. J., Schausser, L., Andersen, S. U., Villesen, P., Schierup, M. H., Bilde, T., and Wang, J. (2014) Spider genomes provide insight into composition and evolution of venom and silk. *Nat. Commun.* **5**, 3765

194. Grbić, M., Van Leeuwen, T., Clark, R. M., Rombauts, S., Rouzé, P., Grbić, V., Osborne, E. J., Dermauw, W., Thi Ngoc, P. C., Ortego, F., Hernández-Crespo, P., Diaz, I., Martinez, M., Navajas, M., Sucena, É., Magalhães, S., Nagy, L., Pace, R. M., Djuranović, S., Smagghe, G., Iga, M., Christiaens, O., Veenstra, J. A., Ewer, J., Villalobos, R. M., Hutter, J. L., Hudson, S. D., Velez, M., Yi, S. V., Zeng, J., Pires-daSilva, A., Roch, F., Cazaux, M., Navarro, M., Zhurov, V., Acevedo, G., Bjelica, A., Fawcett, J. A., Bonnet, E., Martens, C., Baele, G., Wissler, L., Sanchez-Rodriguez, A., Tirry, L., Blais, C., Demeestere, K., Henz, S. R., Gregory, T. R., Mathieu, J., Verdon, L., Farinelli, L., Schmutz, J., Lindquist, E., Feyereisen, R., and Van de Peer, Y. (2011) The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. *Nature* **479**, 487–492
195. Vonk, F. J., Casewell, N. R., Henkel, C. V., Heimberg, A. M., Jansen, H. J., McCleary, R. J. R., Kerckamp, H. M. E., Vos, R. A., Guerreiro, I., Calvete, J. J., Wüster, W., Woods, A. E., Logan, J. M., Harrison, R. A., Castoe, T. A., de Koning, A. P. J., Pollock, D. D., Yandell, M., Calderon, D., Renjifo, C., Currier, R. B., Salgado, D., Pla, D., Sanz, L., Hyder, A. S., Ribeiro, J. M. C., Arntzen, J. W., van den Thillart, G. E. E. J. M., Boetzer, M., Pirovano, W., Dirks, R. P., Spaink, H. P., Duboule, D., McGlenn, E., Kini, R. M., and Richardson, M. K. (2013) The king cobra genome reveals dynamic gene evolution and adaptation in the snake venom system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 20651–6
196. Gao, B., Peigneur, S., Tytgat, J., and Zhu, S. (2010) A potent potassium channel blocker from *Mesobuthus eupeus* scorpion venom. *Biochimie* **92**, 1847–53
197. Chandy, K. G., Cahalan, M., Pennington, M., Norton, R. S., Wulff, H., and Gutman, G. A. (2001) Potassium channels in T lymphocytes: toxins to therapeutic immunosuppressants. *Toxicon* **39**, 1269–76
198. Kharrat, R., Mansuelle, P., Sampieri, F., Crest, M., Oughideni, R., Van Rietschoten, J., Martin-Eauclaire, M. F., Rochat, H., and El Ayeb, M. (1997) Maurotoxin, a four disulfide bridge toxin from *Scorpio maurus* venom: purification, structure and action on potassium channels. *FEBS Lett.* **406**, 284–90
199. Helms, L. M., Felix, J. P., Bugianesi, R. M., Garcia, M. L., Stevens, S., Leonard, R. J., Knaus, H. G., Koch, R., Wanner, S. G., Kaczorowski, G. J., and Slaughter, R. S. (1997) Margatoxin binds to a homomultimer of K(V)1.3 channels in Jurkat cells. Comparison with K(V)1.3 expressed in CHO cells. *Biochemistry* **36**, 3737–44
200. Nekrasova, O. V., Ignatova, A. A., Nazarova, A. I., Feofanov, A. V., Korolkova, Y. V., Boldyreva, E. F., Tagvei, A. I., Grishin, E. V., Arseniev, A. S., and Kirpichnikov, M. P. (2009) Recombinant Kv channels at the membrane of *Escherichia coli* bind specifically agitoxin2. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **4**, 83–91
201. Beeton, C., Wulff, H., Singh, S., Botsko, S., Crossley, G., Gutman, G. A., Cahalan, M. D., Pennington, M., and Chandy, K. G. (2003) A novel fluorescent toxin to detect and investigate Kv1.3 channel up-regulation in chronically activated T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **278**, 9928–37
202. Freudenthaler, G., Axmann, M., Schindler, H., Pragl, B., Knaus, H.-G., and Schütz, G. J. (2002) Ultrasensitive pharmacological characterisation of the voltage-gated potassium channel K(V)1.3 studied by single-molecule fluorescence microscopy. *Histochem. Cell Biol.* **117**, 197–202

203. Warrell, D. A. (2010) Snake bite. *Lancet* **375**, 77–88
204. Mouhat, S., Andreotti, N., Jouirou, B., and Sabatier, J.-M. (2008) Animal toxins acting on voltage-gated potassium channels. *Curr. Pharm. Des.* **14**, 2503–18
205. Doley, R., and Kini, R. M. (2009) Protein complexes in snake venom. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 2851–71
206. Koh, D. C. I., Armugam, A., and Jeyaseelan, K. (2006) Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 3030–41
207. Benishin, C. G., Sorensen, R. G., Brown, W. E., Krueger, B. K., and Blaustein, M. P. (1988) Four polypeptide components of green mamba venom selectively block certain potassium channels in rat brain synaptosomes. *Mol. Pharmacol.* **34**, 152–9
208. Berndt, K. D., Güntert, P., and Wüthrich, K. (1993) Nuclear magnetic resonance solution structure of dendrotoxin K from the venom of *Dendroaspis polylepsis polylepsis*. *J. Mol. Biol.* **234**, 735–50
209. Strydom, D. J. (1973) Protease inhibitors as snake venom toxins. *Nat. New Biol.* **243**, 88–9
210. Robertson, B., Owen, D., Stow, J., Butler, C., and Newland, C. (1996) Novel effects of dendrotoxin homologues on subtypes of mammalian Kv1 potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett.* **383**, 26–30
211. Daly, M., Fautin, D. G., and Cappola, V. A. (2003) Systematics of the hexacorallia (Cnidaria: Anthozoa). *Zool. J. Linn. Soc.* **139**, 419–437
212. Anderluh, G., and Macek, P. (2002) Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon* **40**, 111–24
213. Norton, R. S. (1991) Structure and structure-function relationships of sea anemone proteins that interact with the sodium channel. *Toxicon* **29**, 1051–84
214. Castañeda, O., Sotolongo, V., Amor, A. M., Stöcklin, R., Anderson, A. J., Harvey, A. L., Engström, A., Wernstedt, C., and Karlsson, E. (1995) Characterization of a potassium channel toxin from the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* **33**, 603–13
215. Diochot, S., Baron, A., Rash, L. D., Deval, E., Escoubas, P., Scarzello, S., Salinas, M., and Lazdunski, M. (2004) A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. *EMBO J.* **23**, 1516–25
216. Andreev, Y. A., Kozlov, S. A., Koshelev, S. G., Ivanova, E. A., Monastyrnaya, M. M., Kozlovskaya, E. P., and Grishin, E. V (2008) Analgesic compound from sea anemone *Heteractis crispa* is the first polypeptide inhibitor of vanilloid receptor 1 (TRPV1). *J. Biol. Chem.* **283**, 23914–21
217. Frazão, B., Vasconcelos, V., and Antunes, A. (2012) Sea anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) toxins: an overview. *Mar. Drugs* **10**, 1812–51

218. Honma, T., and Shiomi, K. (2005) Peptide toxins in sea anemones: structural and functional aspects. *Mar. Biotechnol. (NY)*. **8**, 1–10
219. Minagawa, S., Ishida, M., Nagashima, Y., and Shiomi, K. (1998) Primary structure of a potassium channel toxin from the sea anemone *Actinia equina*. *FEBS Lett.* **427**, 149–51
220. Cotton, J., Crest, M., Bouet, F., Alessandri, N., Gola, M., Forest, E., Karlsson, E., Castañeda, O., Harvey, A. L., Vita, C., and 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. *Eur. J. Biochem.* **244**, 192–202
221. Gendeh, G. S., Young, L. C., de Medeiros, C. L., Jeyaseelan, K., Harvey, A. L., and Chung, M. C. (1997) A new potassium channel toxin from the sea anemone *Heteractis magnifica*: isolation, cDNA cloning, and functional expression. *Biochemistry* **36**, 11461–71
222. Peigneur, S., Billen, B., Derua, R., Waelkens, E., Debaveye, S., Béress, L., and Tytgat, J. (2011) A bifunctional sea anemone peptide with Kunitz type protease and potassium channel inhibiting properties. *Biochem. Pharmacol.* **82**, 81–90
223. Schweitz, H., Bruhn, T., Guillemare, E., Moinier, D., Lancelin, J. M., Béress, L., and Lazdunski, M. (1995) Kaliclutidines and kaliseptine. Two different classes of sea anemone toxins for voltage sensitive K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* **270**, 25121–6
224. Diochot, S., Schweitz, H., Béress, L., and Lazdunski, M. (1998) Sea anemone peptides with a specific blocking activity against the fast inactivating potassium channel Kv3.4. *J. Biol. Chem.* **273**, 6744–9
225. Honma, T., Hasegawa, Y., Ishida, M., Nagai, H., Nagashima, Y., and Shiomi, K. (2005) Isolation and molecular cloning of novel peptide toxins from the sea anemone *Antheopsis maculata*. *Toxicon* **45**, 33–41
226. Diochot, S., Loret, E., Bruhn, T., Béress, L., and Lazdunski, M. (2003) APETx1, a new toxin from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*, blocks voltage-gated human ether-a-go-go-related gene potassium channels. *Mol. Pharmacol.* **64**, 59–69
227. Rauer, H., Pennington, M., Cahalan, M., and Chandy, K. G. (1999) Structural conservation of the pores of calcium-activated and voltage-gated potassium channels determined by a sea anemone toxin. *J. Biol. Chem.* **274**, 21885–92
228. Tucker, J. K., and Tenorio, M. J. (2009) Systematic classification of Recent and fossil conoidean gastropods. *Hackenheim: Conchbooks*, 133
229. Livett, B. G., Gayler, K. R., and Khalil, Z. (2004) Drugs from the sea: conopeptides as potential therapeutics. *Curr. Med. Chem.* **11**, 1715–23
230. Lewis, R. J., Dutertre, S., Vetter, I., and Christie, M. J. (2012) *Conus* venom peptide pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **64**, 259–98

231. Teichert, R. W., Jacobsen, R., Terlau, H., Yoshikami, D., and Olivera, B. M. (2007) Discovery and characterization of the short kappaA-conotoxins: a novel subfamily of excitatory conotoxins. *Toxicon* **49**, 318–28
232. Santos, A. D., McIntosh, J. M., Hillyard, D. R., Cruz, L. J., and Olivera, B. M. (2004) The A-superfamily of conotoxins: structural and functional divergence. *J. Biol. Chem.* **279**, 17596–606
233. Wang, C.-Z., Jiang, H., Ou, Z.-L., Chen, J.-S., and Chi, C.-W. (2003) cDNA cloning of two A-superfamily conotoxins from *Conus striatus*. *Toxicon* **42**, 613–9
234. Shon, K. J., Stocker, M., Terlau, H., Stühmer, W., Jacobsen, R., Walker, C., Grilley, M., Watkins, M., Hillyard, D. R., Gray, W. R., and Olivera, B. M. (1998) kappa-Conotoxin PVIIA is a peptide inhibiting the shaker K⁺ channel. *J. Biol. Chem.* **273**, 33–8
235. Savarin, P., Guennegues, M., Gilquin, B., Lamthanh, H., Gasparini, S., Zinn-Justin, S., and Ménez, A. (1998) Three-dimensional structure of kappa-conotoxin PVIIA, a novel potassium channel-blocking toxin from cone snails. *Biochemistry* **37**, 5407–16
236. Ferber, M., Sporning, A., Jeserich, G., DeLaCruz, R., Watkins, M., Olivera, B. M., and Terlau, H. (2003) A novel conus peptide ligand for K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* **278**, 2177–83
237. Al-Sabi, A., Lennartz, D., Ferber, M., Gulyas, J., Rivier, J. E. F., Olivera, B. M., Carlomagno, T., and Terlau, H. (2004) KappaM-conotoxin RIIK, structural and functional novelty in a K⁺ channel antagonist. *Biochemistry* **43**, 8625–35
238. Aguilar, M. B., López-Vera, E., Heimer de la Cotera, E. P., Falcón, A., Olivera, B. M., and Maillo, M. (2007) I-conotoxins in vermivorous species of the West Atlantic: peptide sr11a from *Conus spurius*. *Peptides* **28**, 18–23
239. Fan, C.-X., Chen, X.-K., Zhang, C., Wang, L.-X., Duan, K.-L., He, L.-L., Cao, Y., Liu, S.-Y., Zhong, M.-N., Ulens, C., Tytgat, J., Chen, J.-S., Chi, C.-W., and Zhou, Z. (2003) A novel conotoxin from *Conus betulinus*, kappa-BtX, unique in cysteine pattern and in function as a specific BK channel modulator. *J. Biol. Chem.* **278**, 12624–33
240. Aguilar, M. B., Pérez-Reyes, L. I., López, Z., de la Cotera, E. P. H., Falcón, A., Ayala, C., Galván, M., Salvador, C., and Escobar, L. I. (2010) Peptide sr11a from *Conus spurius* is a novel peptide blocker for Kv1 potassium channels. *Peptides* **31**, 1287–91
241. Kaufenstein, S., Huys, I., Lamthanh, H., Stöcklin, R., Sotto, F., Menez, A., Tytgat, J., and Mebs, D. (2003) A novel conotoxin inhibiting vertebrate voltage-sensitive potassium channels. *Toxicon* **42**, 43–52
242. Möller, C., Rahmankhah, S., Lauer-Fields, J., Bubis, J., Fields, G. B., and Marí, F. (2005) A novel conotoxin framework with a helix-loop-helix (Cs alpha/alpha) fold. *Biochemistry* **44**, 15986–96
243. Imperial, J. S., Bansal, P. S., Alewood, P. F., Daly, N. L., Craik, D. J., Sporning, A., Terlau, H., López-Vera, E., Bandyopadhyay, P. K., and Olivera, B. M. (2006) A novel conotoxin inhibitor of Kv1.6 channel and nAChR subtypes defines a new superfamily of conotoxins. *Biochemistry* **45**, 8331–40

244. Bayrhuber, M., Vijayan, V., Ferber, M., Graf, R., Korukottu, J., Imperial, J., Garrett, J. E., Olivera, B. M., Terlau, H., Zweckstetter, M., and Becker, S. (2005) Conkunitzin-S1 is the first member of a new Kunitz-type neurotoxin family. Structural and functional characterization. *J. Biol. Chem.* **280**, 23766–70
245. Massilia, G. R., Schininà, M. E., Ascenzi, P., and Polticelli, F. (2001) Contryphan-Vn: a novel peptide from the venom of the Mediterranean snail *Conus ventricosus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288**, 908–13
246. Dy, C. Y., Buczek, P., Imperial, J. S., Bulaj, G., and Horvath, M. P. (2006) Structure of conkunitzin-S1, a neurotoxin and Kunitz-fold disulfide variant from cone snail. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **62**, 980–90
247. Terlau, H., and Olivera, B. M. (2004) *Conus* venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiol. Rev.* **84**, 41–68
248. Craig, A. G., Zafaralla, G., Cruz, L. J., Santos, A. D., Hillyard, D. R., Dykert, J., Rivier, J. E., Gray, W. R., Imperial, J., Delacruz, R. G., Sporning, A., Terlau, H., West, P. J., Yoshikami, D., and Olivera, B. M. (1998) An O-glycosylated neuroexcitatory conus peptide. *Biochemistry* **37**, 16019–25
249. Eliseo, T., Cicero, D. O., Romeo, C., Schininà, M. E., Massilia, G. R., Polticelli, F., Ascenzi, P., and Paci, M. (2004) Solution structure of the cyclic peptide contryphan-Vn, a Ca²⁺-dependent K⁺ channel modulator. *Biopolymers* **74**, 189–98
250. Palma, M. S. (2013) Hymenoptera insect peptides. *Handb. Biol. Act. Pept.*, 416–422
251. Haux, P., Sawerthal, H., and Habermann, E. (1967) Sequence analysis of bee venom neurotoxin (apamine) from its tryptic and chymotryptic cleavage products. *Hoppe-Seylers. Z. Physiol. Chem.* **348**, 737–8
252. Овчинников, Ю. А., Мирошников, А. И., Куделин, А. Б., Костина, М. Б., Бойков, В. А., Магазаник, Л. Г., and Готгильф, И. М. (1980) Структура и пресинаптическое действие тертиапина – нейротоксина из яда медоносной пчелы *Apis mellifera*. *Биоорганическая химия* **6**, 359–365
253. Pease, J. H., and Wemmer, D. E. (1988) Solution structure of apamin determined by nuclear magnetic resonance and distance geometry. *Biochemistry* **27**, 8491–8
254. Andrianov, A. M., and Akhrem, A. A. (1991) [Spatial structure of apamin in solution]. *Mol. Biol. (Mosk)*. **25**, 937–45
255. Xu, X., and Nelson, J. W. (1993) Solution structure of tertiapin determined using nuclear magnetic resonance and distance geometry. *Proteins* **17**, 124–37
256. Lazdunski, M. (1983) Apamin, a neurotoxin specific for one class of Ca²⁺-dependent K⁺ channels. *Cell Calcium* **4**, 421–8
257. Labbé-Jullié, C., Granier, C., Albericio, F., Defendini, M. L., Ceard, B., Rochat, H., and Van Rietschoten, J. (1991) Binding and toxicity of apamin. Characterization of the active site. *Eur. J. Biochem.* **196**, 639–45

258. Kanjhan, R., Coulson, E. J., Adams, D. J., and Bellingham, M. C. (2005) Tertiapin-Q blocks recombinant and native large conductance K⁺ channels in a use-dependent manner. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **314**, 1353–61
259. Jin, W., and Lu, Z. (1998) A novel high-affinity inhibitor for inward-rectifier K⁺ channels. *Biochemistry* **37**, 13291–9
260. Jin, W., Klem, A. M., Lewis, J. H., and Lu, Z. (1999) Mechanisms of inward-rectifier K⁺ channel inhibition by tertiapin-Q. *Biochemistry* **38**, 14294–301
261. NMBE - World Spider Catalog (2015) *World Spider Cat. Nat. Hist. Museum Bern* [online] <http://www.wsc.nmbe.ch/> (Accessed January 29, 2015).
262. Василевский, А. А., Козлов, С. А., and Гришин, Е. В. (2009) Молекулярное разнообразие яда пауков. *Успехи биол. химии* **49**, 211–74
263. Kuhn-Nentwig, L., Schaller, J., and Nentwig, W. (2004) Biochemistry, toxicology and ecology of the venom of the spider *Cupiennius salei* (Ctenidae). *Toxicon* **43**, 543–53
264. Wang, J. M., Roh, S. H., Kim, S., Lee, C. W., Kim, J. Il, and Swartz, K. J. (2004) Molecular surface of tarantula toxins interacting with voltage sensors in K(v) channels. *J. Gen. Physiol.* **123**, 455–67
265. Lee, S.-Y., and MacKinnon, R. (2004) A membrane-access mechanism of ion channel inhibition by voltage sensor toxins from spider venom. *Nature* **430**, 232–5
266. Takahashi, H., Kim, J. I., Min, H. J., Sato, K., Swartz, K. J., and Shimada, I. (2000) Solution structure of hanatoxin1, a gating modifier of voltage-dependent K(+) channels: common surface features of gating modifier toxins. *J. Mol. Biol.* **297**, 771–80
267. Diochot, S., Drici, M. D., Moinier, D., Fink, M., and Lazdunski, M. (1999) Effects of phrixotoxins on the Kv4 family of potassium channels and implications for the role of Ito1 in cardiac electrogenesis. *Br. J. Pharmacol.* **126**, 251–63
268. Chagot, B., Escoubas, P., Villegas, E., Bernard, C., Ferrat, G., Corzo, G., Lazdunski, M., and Darbon, H. (2004) Solution structure of Phrixotoxin 1, a specific peptide inhibitor of Kv4 potassium channels from the venom of the theraphosid spider *Phrixotrichus auratus*. *Protein Sci.* **13**, 1197–208
269. Wang, X., Connor, M., Smith, R., Maciejewski, M. W., Howden, M. E., Nicholson, G. M., Christie, M. J., and King, G. F. (2000) Discovery and characterization of a family of insecticidal neurotoxins with a rare vicinal disulfide bridge. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 505–13
270. Liang, S. (2004) An overview of peptide toxins from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena* Wang [=Ornithoctonus huwena (Wang)]. *Toxicon* **43**, 575–85
271. Sanguinetti, M. C., Johnson, J. H., Hammerland, L. G., Kelbaugh, P. R., Volkmann, R. A., Saccomano, N. A., and Mueller, A. L. (1997) Heteropodatoxins: peptides isolated from spider venom that block Kv4.2 potassium channels. *Mol. Pharmacol.* **51**, 491–8

272. Escoubas, P., Diochot, S., C  lerier, M.-L., Nakajima, T., and Lazdunski, M. (2002) Novel tarantula toxins for subtypes of voltage-dependent potassium channels in the Kv2 and Kv4 subfamilies. *Mol. Pharmacol.* **62**, 48–57
273. Li-Smerin, Y., and Swartz, K. J. (1998) Gating modifier toxins reveal a conserved structural motif in voltage-gated Ca²⁺ and K⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 8585–9
274. Yuan, C., Yang, S., Liao, Z., and Liang, S. (2007) Effects and mechanism of Chinese tarantula toxins on the Kv2.1 potassium channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **352**, 799–804
275. Bemporad, D., Sands, Z. A., Wee, C. L., Grottesi, A., and Sansom, M. S. P. (2006) Vstx1, a modifier of Kv channel gating, localizes to the interfacial region of lipid bilayers. *Biochemistry* **45**, 11844–55
276. Possani, L. D. (1982) The primary structure of Noxiustoxin: a K⁺ channel blocking peptide from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Carlsb. Res. Commun.* **47**, 285–9
277. Carbone, E., Wanke, E., Prestipino, G., Possani, L. D., and Maelicke, A. (1982) Selective blockage of voltage-dependent K⁺ channels by a novel scorpion toxin. *Nature* **296**, 90–1
278. Sugg, E. E., Garcia, M. L., Reuben, J. P., Patchett, A. A., and Kaczorowski, G. J. (1990) Synthesis and structural characterization of charybdotoxin, a potent peptidyl inhibitor of the high conductance Ca²⁺(+)-activated K⁺ channel. *J. Biol. Chem.* **265**, 18745–8
279. Miller, C. (1995) The charybdotoxin family of K⁺ channel-blocking peptides. *Neuron* **15**, 5–10
280. Galvez, A., Gimenez-Gallego, G., Reuben, J. P., Roy-Contancin, L., Feigenbaum, P., Kaczorowski, G. J., and Garcia, M. L. (1990) Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *J. Biol. Chem.* **265**, 11083–90
281. Garcia-Calvo, M., Leonard, R. J., Novick, J., Stevens, S. P., Schmalhofer, W., Kaczorowski, G. J., and Garcia, M. L. (1993) Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels. *J. Biol. Chem.* **268**, 18866–74
282. Crest, M., Jacquet, G., Gola, M., Zerrouk, H., Benslimane, A., Rochat, H., Mansuelle, P., and Martin-Eauclaire, M. F. (1992) Kaliotoxin, a novel peptidyl inhibitor of neuronal BK-type Ca²⁺(+)-activated K⁺ channels characterized from *Androctonus mauretanicus mauretanicus* venom. *J. Biol. Chem.* **267**, 1640–7
283. Garcia, M. L., Garcia-Calvo, M., Hidalgo, P., Lee, A., and MacKinnon, R. (1994) Purification and characterization of three inhibitors of voltage-dependent K⁺ channels from *Leiurus quinquestriatus* var. *hebraeus* venom. *Biochemistry* **33**, 6834–9
284. Gao, Y.-D., and Garcia, M. L. (2003) Interaction of agitoxin2, charybdotoxin, and iberiotoxin with potassium channels: selectivity between voltage-gated and Maxi-K channels. *Proteins* **52**, 146–54

285. Srinivasan, K. N., Sivaraja, V., Huys, I., Sasaki, T., Cheng, B., Kumar, T. K. S., Sato, K., Tytgat, J., Yu, C., San, B. C. C., Ranganathan, S., Bowie, H. J., Kini, R. M., and 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. *J. Biol. Chem.* **277**, 30040–7
286. Diego-García, E., Schwartz, E. F., D'Suze, G., González, S. A. R., Batista, C. V. F., García, B. I., de la Vega, R. C. R., and Possani, L. D. (2007) Wide phylogenetic distribution of Scorpine and long-chain beta-KTx-like peptides in scorpion venoms: identification of “orphan” components. *Peptides* **28**, 31–7
287. Zeng, X.-C., Zhang, L., Nie, Y., and Luo, X. (2012) Identification and molecular characterization of three new K⁺-channel specific toxins from the Chinese scorpion *Mesobuthus martensii* Karsch revealing intronic number polymorphism and alternative splicing in duplicated genes. *Peptides* **34**, 311–23
288. Diego-García, E., Batista, C. V. F., García-Gómez, B. I., Lucas, S., Candido, D. M., Gómez-Lagunas, F., and Possani, L. D. (2005) The Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: genes, peptides and function. *Toxicon* **45**, 273–83
289. Pisciotta, M., Coronas, F. I., Bloch, C., Prestipino, G., and Possani, L. D. (2000) Fast K(+) currents from cerebellum granular cells are completely blocked by a peptide purified from *Androctonus australis* Garzoni scorpion venom. *Biochim. Biophys. Acta* **1468**, 203–12
290. Bagdány, M., Batista, C. V. F., Valdez-Cruz, N. A., Somodi, S., Rodríguez de la Vega, R. C., Licea, A. F., Varga, Z., Gáspár, R., Possani, L. D., and Panyi, G. (2005) Anuroctoxin, a new scorpion toxin of the alpha-KTx 6 subfamily, is highly selective for Kv1.3 over IKCa1 ion channels of human T lymphocytes. *Mol. Pharmacol.* **67**, 1034–44
291. Mouhat, S., Jouirou, B., Mosbah, A., De Waard, M., and Sabatier, J.-M. (2004) Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochem. J.* **378**, 717–26
292. Арзамасов, А. А., Василевский, А. А., and Гришин, Е. В. Хлоротоксин и родственные пептиды – короткие инсектотоксины из яда скорпионов. *Биоорганическая химия* **40**, 387–98
293. Blanc, E., Sabatier, J. M., Kharrat, R., Meunier, S., el Ayeb, M., Van Rietschoten, J., and Darbon, H. (1997) Solution structure of maurotoxin, a scorpion toxin from *Scorpio maurus*, with high affinity for voltage-gated potassium channels. *Proteins* **29**, 321–33
294. Saucedo, A. L., Flores-Solis, D., Rodríguez de la Vega, R. C., Ramírez-Cordero, B., Hernández-López, R., Cano-Sánchez, P., Noriega Navarro, R., García-Valdés, J., Coronas-Valderrama, F., de Roodt, A., Brieba, L. G., Domingos Possani, L., and del Río-Portilla, F. (2012) New tricks of an old pattern: structural versatility of scorpion toxins with common cysteine spacing. *J. Biol. Chem.* **287**, 12321–30
295. Chen, Z.-Y., Hu, Y.-T., Yang, W.-S., He, Y.-W., Feng, J., Wang, B., Zhao, R.-M., Ding, J.-P., Cao, Z.-J., Li, W.-X., and Wu, Y.-L. (2012) Hg1, novel peptide inhibitor specific for Kv1.3 channels from first scorpion Kunitz-type potassium channel toxin family. *J. Biol. Chem.* **287**, 13813–21

296. Chen, Z., Hu, Y., Han, S., Yin, S., He, Y., Wu, Y., Cao, Z., and Li, W. (2011) ImKTx1, a new Kv1.3 channel blocker with a unique primary structure. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **25**, 244–51
297. Tytgat, J., Chandy, K. G., Garcia, M. L., Gutman, G. A., Martin-Eauclaire, M. F., van der Walt, J. J., and Possani, L. D. (1999) A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. *Trends Pharmacol. Sci.* **20**, 444–7
298. Diego-García, E., Caliskan, F., and Tytgat, J. (2014) The Mediterranean scorpion *Mesobuthus gibbosus* (Scorpiones, Buthidae): transcriptome analysis and organization of the genome encoding chlorotoxin-like peptides. *BMC Genomics* **15**, 295
299. He, Y., Zhao, R., Di, Z., Li, Z., Xu, X., Hong, W., Wu, Y., Zhao, H., Li, W., and Cao, Z. (2013) Molecular diversity of Chaerilidae venom peptides reveals the dynamic evolution of scorpion venom components from Buthidae to non-Buthidae. *J. Proteomics* **89**, 1–14
300. Diego-García, E., Peigneur, S., Debaveye, S., Gheldof, E., Tytgat, J., and Caliskan, F. (2013) Novel potassium channel blocker venom peptides from *Mesobuthus gibbosus* (Scorpiones: Buthidae). *Toxicon* **61**, 72–82
301. Cologna, C. T., Peigneur, S., Rosa, J. C., Selistre-de-Araujo, H. S., Varanda, W. A., Tytgat, J., and Arantes, E. C. (2011) Purification and characterization of Ts15, the first member of a new α -KTX subfamily from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon* **58**, 54–61
302. Schwartz, E. F., Diego-Garcia, E., Rodríguez de la Vega, R. C., and Possani, L. D. (2007) Transcriptome analysis of the venom gland of the Mexican scorpion *Hadrurus gertschi* (Arachnida: Scorpiones). *BMC Genomics* **8**, 119
303. Zhu, S., Gao, B., Aumelas, A., del Carmen Rodríguez, M., Lanz-Mendoza, H., Peigneur, S., Diego-Garcia, E., Martin-Eauclaire, M.-F., Tytgat, J., and Possani, L. D. (2010) MeuTXKbeta1, a scorpion venom-derived two-domain potassium channel toxin-like peptide with cytolytic activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1804**, 872–83
304. Diego-García, E., Abdel-Mottaleb, Y., Schwartz, E. F., de la Vega, R. C. R., Tytgat, J., and Possani, L. D. (2008) Cytolytic and K⁺ channel blocking activities of beta-KTx and scorpine-like peptides purified from scorpion venoms. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 187–200
305. Korolkova, Y. V., Kozlov, S. A., Lipkin, A. V., Pluzhnikov, K. A., Hadley, J. K., Filippov, A. K., Brown, D. A., Angelo, K., Strøbaek, D., Jespersen, T., Olesen, S. P., Jensen, B. S., and Grishin, E. V (2001) An ERG channel inhibitor from the scorpion *Buthus eupeus*. *J. Biol. Chem.* **276**, 9868–76
306. Corona, M., Gurrola, G. B., Merino, E., Cassulini, R. R., Valdez-Cruz, N. A., García, B., Ramírez-Domínguez, M. E., Coronas, F. I. V., Zamudio, F. Z., Wanke, E., and Possani, L. D. (2002) A large number of novel Ergtoxin-like genes and ERG K⁺-channels blocking peptides from scorpions of the genus *Centruroides*. *FEBS Lett.* **532**, 121–6
307. Gairí, M., Romi, R., Fernández, I., Rochat, H., Martin-Eauclaire, M. F., Van Rietschoten, J., Pons, M., and Giralt, E. (1997) 3D structure of kaliotoxin: is residue 34 a key for channel selectivity? *J. Pept. Sci.* **3**, 314–9

308. Torres, A. M., Bansal, P., Alewood, P. F., Bursill, J. A., Kuchel, P. W., and Vandenberg, J. I. (2003) Solution structure of CnErg1 (Ergotoxin), a HERG specific scorpion toxin. *FEBS Lett.* **539**, 138–42
309. M'Barek, S., Lopez-Gonzalez, I., Andreotti, N., di Luccio, E., Visan, V., Grissmer, S., Judge, S., El Ayeb, M., Darbon, H., Rochat, H., Sampieri, F., Béraud, E., Fajloun, Z., De Waard, M., and Sabatier, J.-M. (2003) A maurotoxin with constrained standard disulfide bridging: innovative strategy of chemical synthesis, pharmacology, and docking on K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* **278**, 31095–104
310. Fajloun, Z., Mosbah, A., Carlier, E., Mansuelle, P., Sandoz, G., Fathallah, M., di Luccio, E., Devaux, C., Rochat, H., Darbon, H., De Waard, M., and Sabatier, J. M. (2000) Maurotoxin versus P1/HsTx1 scorpion toxins. Toward new insights in the understanding of their distinct disulfide bridge patterns. *J. Biol. Chem.* **275**, 39394–402
311. Coronas, F. V., de Roodt, A. R., Portugal, T. O., Zamudio, F. Z., Batista, C. V. F., Gómez-Lagunas, F., and Possani, L. D. (2003) Disulfide bridges and blockage of Shaker B K⁽⁺⁾-channels by another butantoxin peptide purified from the Argentinean scorpion *Tityus trivittatus*. *Toxicon* **41**, 173–9
312. Chagot, B., Pimentel, C., Dai, L., Pil, J., Tytgat, J., Nakajima, T., Corzo, G., Darbon, H., and Ferrat, G. (2005) An unusual fold for potassium channel blockers: NMR structure of three toxins from the scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochem. J.* **388**, 263–71
313. Zhao, R., Dai, H., Qiu, S., Li, T., He, Y., Ma, Y., Chen, Z., Wu, Y., Li, W., and Cao, Z. (2011) SdPI, the first functionally characterized Kunitz-type trypsin inhibitor from scorpion venom. *PLoS One* **6**, e27548
314. Gao, B., Harvey, P. J., Craik, D. J., Ronjat, M., De Waard, M., and Zhu, S. (2013) Functional evolution of scorpion venom peptides with an inhibitor cystine knot fold. *Biosci. Rep.* **33**
315. Zhijian, C., Yun, X., Chao, D., Shunyi, Z., Shijin, Y., Yingliang, W., and Wenxin, L. (2006) Cloning and characterization of a novel calcium channel toxin-like gene BmCa1 from Chinese scorpion *Mesobuthus martensii* Karsch. *Peptides* **27**, 1235–40
316. Varga, Z., Gurrola-Briones, G., Papp, F., Rodríguez de la Vega, R. C., Pedraza-Alva, G., Tajhya, R. B., Gaspar, R., Cardenas, L., Rosenstein, Y., Beeton, C., Possani, L. D., and Panyi, G. (2012) Vm24, a natural immunosuppressive peptide, potently and selectively blocks Kv1.3 potassium channels of human T cells. *Mol. Pharmacol.* **82**, 372–82
317. Dudina, E. E., Korolkova, Y. V., Bocharova, N. E., Koshelev, S. G., Egorov, T. A., Huys, I., Tytgat, J., and Grishin, E. V (2001) OsK2, a new selective inhibitor of Kv1.2 potassium channels purified from the venom of the scorpion *Orthochirus scrobiculosus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**, 841–7
318. Swartz, K. J. (2004) Towards a structural view of gating in potassium channels. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 905–16
319. Catterall, W. A., Cestèle, S., Yarov-Yarovoy, V., Yu, F. H., Konoki, K., and Scheuer, T. (2007) Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon* **49**, 124–41

320. Jiménez-Vargas, J. M., Restano-Cassulini, R., and Possani, L. D. (2012) Toxin modulators and blockers of hERG K(+) channels. *Toxicon* **60**, 492–501
321. Tenenholz, T. C., Klenk, K. C., Matteson, D. R., Blaustein, M. P., and Weber, D. J. (2000) Structural determinants of scorpion toxin affinity: the charybdotoxin (alpha-KTX) family of K(+)-channel blocking peptides. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **140**, 135–85
322. Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (2002) Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* **417**, 515–22
323. MacKinnon, R., Cohen, S. L., Kuo, A., Lee, A., and Chait, B. T. (1998) Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels. *Science* **280**, 106–9
324. Legros, C., Pollmann, V., Knaus, H. G., Farrell, A. M., Darbon, H., Bougis, P. E., Martin-Eauclaire, M. F., and Pongs, O. (2000) Generating a high affinity scorpion toxin receptor in KcsA-Kv1.3 chimeric potassium channels. *J. Biol. Chem.* **275**, 16918–24
325. Legros, C., Schulze, C., Garcia, M. L., Bougis, P. E., Martin-Eauclaire, M.-F., and Pongs, O. (2002) Engineering-specific pharmacological binding sites for peptidyl inhibitors of potassium channels into KcsA. *Biochemistry* **41**, 15369–75
326. Goldstein, S. A., Pheasant, D. J., and Miller, C. (1994) The charybdotoxin receptor of a Shaker K+ channel: peptide and channel residues mediating molecular recognition. *Neuron* **12**, 1377–88
327. Hidalgo, P., and MacKinnon, R. (1995) Revealing the architecture of a K+ channel pore through mutant cycles with a peptide inhibitor. *Science* **268**, 307–10
328. Ranganathan, R., Lewis, J. H., and MacKinnon, R. (1996) Spatial localization of the K+ channel selectivity filter by mutant cycle-based structure analysis. *Neuron* **16**, 131–9
329. Lecomte, C., Ferrat, G., Fajloun, Z., Van Rietschoten, J., Rochat, H., Martin-Eauclaire, M. F., Darbon, H., and Sabatier, J. M. (1999) Chemical synthesis and structure-activity relationships of Ts kappa, a novel scorpion toxin acting on apamin-sensitive SK channel. *J. Pept. Res.* **54**, 369–76
330. Shakkottai, V. G., Regaya, I., Wulff, H., Fajloun, Z., Tomita, H., Fathallah, M., Cahalan, M. D., Gargus, J. J., Sabatier, J. M., and Chandy, K. G. (2001) Design and characterization of a highly selective peptide inhibitor of the small conductance calcium-activated K+ channel, SkCa2. *J. Biol. Chem.* **276**, 43145–51
331. Pedarzani, P., D'hoedt, D., Doorty, K. B., Wadsworth, J. D. F., Joseph, J. S., Jeyaseelan, K., Kini, R. M., Gadre, S. V, Sapatnekar, S. M., Stocker, M., and Strong, P. N. (2002) Tamapin, a venom peptide from the Indian red scorpion (*Mesobuthus tamulus*) that targets small conductance Ca²⁺-activated K+ channels and afterhyperpolarization currents in central neurons. *J. Biol. Chem.* **277**, 46101–9
332. Korolkova, Y. V, Bocharov, E. V, Angelo, K., Maslennikov, I. V, Grinenko, O. V, Lipkin, A. V, Nosyreva, E. D., Pluzhnikov, K. A., Olesen, S.-P., Arseniev, A. S., and Grishin, E. V (2002) New binding site on common molecular scaffold provides HERG channel specificity of scorpion toxin BeKm-1. *J. Biol. Chem.* **277**, 43104–9

333. Pardo-Lopez, L., Zhang, M., Liu, J., Jiang, M., Possani, L. D., and Tseng, G.-N. (2002) Mapping the binding site of a human ether-a-go-go-related gene-specific peptide toxin (ErgTx) to the channel's outer vestibule. *J. Biol. Chem.* **277**, 16403–11
334. Dauplais, M., Lecoq, A., Song, J., Cotton, J., Jamin, N., Gilquin, B., Roumestand, C., Vita, C., de Medeiros, C. L., Rowan, E. G., Harvey, A. L., and 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. *J. Biol. Chem.* **272**, 4302–9
335. Gasparini, S., Danse, J. M., Lecoq, A., Pinkasfeld, S., Zinn-Justin, S., Young, L. C., de Medeiros, C. C., Rowan, E. G., Harvey, A. L., and 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. *J. Biol. Chem.* **273**, 25393–403
336. Banerjee, A., Lee, A., Campbell, E., and Mackinnon, R. (2013) Structure of a pore-blocking toxin in complex with a eukaryotic voltage-dependent K(+) channel. *Elife* **2**, e00594
337. Carlier, E., Avdonin, V., Geib, S., Fajloun, Z., Kharrat, R., Rochat, H., Sabatier, J. M., Hoshi, T., and De Waard, M. (2000) Effect of maurotoxin, a four disulfide-bridged toxin from the chactoid scorpion *Scorpio maurus*, on Shaker K⁺ channels. *J. Pept. Res.* **55**, 419–27
338. Mouhat, S., Mosbah, A., Visan, V., Wulff, H., Delepierre, M., Darbon, H., Grissmer, S., De Waard, M., and Sabatier, J.-M. (2004) The “functional” dyad of scorpion toxin Pi1 is not itself a prerequisite for toxin binding to the voltage-gated Kv1.2 potassium channels. *Biochem. J.* **377**, 25–36
339. M'Barek, S., Mosbah, A., Sandoz, G., Fajloun, Z., Olamendi-Portugal, T., Rochat, H., Sampieri, F., Guijarro, J. I., Mansuelle, P., Delepierre, M., De Waard, M., and Sabatier, J.-M. (2003) Synthesis and characterization of Pi4, a scorpion toxin from *Pandinus imperator* that acts on K⁺ channels. *Eur. J. Biochem.* **270**, 3583–92
340. 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., and Sabatier, J.-M. (2004) Cobatoxin 1 from *Centruroides noxius* scorpion venom: chemical synthesis, three-dimensional structure in solution, pharmacology and docking on K⁺ channels. *Biochem. J.* **377**, 37–49
341. Batista, C. V. F., Gómez-Lagunas, F., Rodríguez de la Vega, R. C., Hajdu, P., Panyi, G., Gáspár, R., and Possani, L. D. (2002) Two novel toxins from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* that block Kv1.3 and Shaker B K(+) channels with distinctly different affinities. *Biochim. Biophys. Acta* **1601**, 123–31
342. Katoh, E., Nishio, H., Inui, T., Nishiuchi, Y., Kimura, T., Sakakibara, S., and Yamazaki, T. (2000) Structural basis for the biological activity of dendrotoxin-I, a potent potassium channel blocker. *Biopolymers* **54**, 44–57
343. Lipkind, G. M., and Fozzard, H. A. (1997) A model of scorpion toxin binding to voltage-gated K⁺ channels. *J. Membr. Biol.* **158**, 187–96

344. Gehlert, D. R., and Gackenhaimer, S. L. (1993) Comparison of the distribution of binding sites for the potassium channel ligands [125I]apamin, [125I]charybdotoxin and [125I]iodoglyburide in the rat brain. *Neuroscience* **52**, 191–205
345. Shimony, E., Sun, T., Kolmakova-Partensky, L., and Miller, C. (1994) Engineering a uniquely reactive thiol into a cysteine-rich peptide. *Protein Eng.* **7**, 503–7
346. Pardo, L. A., and Stühmer, W. (2014) The roles of K(+) channels in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 39–48
347. Lewis, R. J., and Garcia, M. L. (2003) Therapeutic potential of venom peptides. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 790–802
348. Vázquez, J., Feigenbaum, P., Katz, G., King, V. F., Reuben, J. P., Roy-Contancin, L., Slaughter, R. S., Kaczorowski, G. J., and Garcia, M. L. (1989) Characterization of high affinity binding sites for charybdotoxin in sarcolemmal membranes from bovine aortic smooth muscle. Evidence for a direct association with the high conductance calcium-activated potassium channel. *J. Biol. Chem.* **264**, 20902–9
349. Auguste, P., Hugues, M., Mourre, C., Moinier, D., Tartar, A., and Lazdunski, M. (1992) Scyllatoxin, a blocker of Ca(2+)-activated K⁺ channels: structure-function relationships and brain localization of the binding sites. *Biochemistry* **31**, 648–54
350. Knaus, H. G., Schwarzer, C., Koch, R. O., Eberhart, A., Kaczorowski, G. J., Glossmann, H., Wunder, F., Pongs, O., Garcia, M. L., and Sperk, G. (1996) Distribution of high-conductance Ca(2+)-activated K⁺ channels in rat brain: targeting to axons and nerve terminals. *J. Neurosci.* **16**, 955–63
351. Knaus, H. G., Koch, R. O., Eberhart, A., Kaczorowski, G. J., Garcia, M. L., and Slaughter, R. S. (1995) [125I]margatoxin, an extraordinarily high affinity ligand for voltage-gated potassium channels in mammalian brain. *Biochemistry* **34**, 13627–34
352. Garcia-Calvo, M., Knaus, H. G., McManus, O. B., Giangiacomo, K. M., Kaczorowski, G. J., and Garcia, M. L. (1994) Purification and reconstitution of the high-conductance, calcium-activated potassium channel from tracheal smooth muscle. *J. Biol. Chem.* **269**, 676–82
353. Knaus, H. G., Garcia-Calvo, M., Kaczorowski, G. J., and Garcia, M. L. (1994) Subunit composition of the high conductance calcium-activated potassium channel from smooth muscle, a representative of the mSlo and slowpoke family of potassium channels. *J. Biol. Chem.* **269**, 3921–4
354. Bergeron, Z. L., and Bingham, J.-P. (2012) Scorpion toxins specific for potassium (K⁺) channels: a historical overview of peptide bioengineering. *Toxins (Basel)*. **4**, 1082–119
355. Jimenez-Gonzalez, C., McLaren, G. J., and Dale, N. (2003) Development of Ca²⁺-channel and BK-channel expression in embryos and larvae of *Xenopus laevis*. *Eur. J. Neurosci.* **18**, 2175–2187
356. Pragl, B., Koschak, A., Trieb, M., Obermair, G., Kaufmann, W. A., Gerster, U., Blanc, E., Hahn, C., Prinz, H., Schütz, G., Darbon, H., Gruber, H. J., and Knaus, H.-G. (2002) Synthesis, characterization, and application of cy-dye- and alexa-dye-labeled

- hongotoxin(1) analogues. The first high affinity fluorescence probes for voltage-gated K⁺ channels. *Bioconjug. Chem.* **13**, 416–25
357. Bingham, J.-P., Bian, S., Tan, Z.-Y., Takacs, Z., and Moczydlowski, E. (2006) Synthesis of a biotin derivative of iberiotoxin: binding interactions with streptavidin and the BK Ca²⁺-activated K⁺ channel expressed in a human cell line. *Bioconjug. Chem.* **17**, 689–99
358. Hafidi, A., Beurg, M., and Dulon, D. (2005) Localization and developmental expression of BK channels in mammalian cochlear hair cells. *Neuroscience* **130**, 475–84
359. Clare, J. J. (2010) Targeting ion channels for drug discovery. *Discov. Med.* **9**, 253–60
360. Overington, J. P., Al-Lazikani, B., and Hopkins, A. L. (2006) How many drug targets are there? *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 993–6
361. Alexander, S. P. H., Benson, H. E., Faccenda, E., Pawson, A. J., Sharman, J. L., McGrath, J. C., Catterall, W. A., Spedding, M., Peters, J. A., Harmar, A. J., Abul-Hasn, N., Anderson, C. M., Anderson, C. M. H., Araiksinen, M. S., Arita, M., Arthofer, E., Barker, E. L., Barratt, C., Barnes, N. M., Bathgate, R., Beart, P. M., Belelli, D., Bennett, A. J., Birdsall, N. J. M., Boison, D., Bonner, T. I., Brailsford, L., Bröer, S., Brown, P., Calo, G., Carter, W. G., Catterall, W. A., Chan, S. L. F., Chao, M. V., Chiang, N., Christopoulos, A., Chun, J. J., Cidlowski, J., Clapham, D. E., Cockcroft, S., Connor, M. A., Cox, H. M., Cuthbert, A., Dautzenberg, F. M., Davenport, A. P., Dawson, P. A., Dent, G., Dijksterhuis, J. P., Dollery, C. T., Dolphin, A. C., Donowitz, M., Dubocovich, M. L., Eiden, L., Eidne, K., Evans, B. A., Fabbro, D., Fahlke, C., Farndale, R., Fitzgerald, G. A., Fong, T. M., Fowler, C. J., Fry, J. R., Funk, C. D., Futerman, A. H., Ganapathy, V., Gainsier, B., Gershengorn, M. A., Goldin, A., Goldman, I. D., Gundlach, A. L., Hagenbuch, B., Hales, T. G., Hammond, J. R., Hamon, M., Hancox, J. C., Hauger, R. L., Hay, D. L., Hobbs, A. J., Hollenberg, M. D., Holliday, N. D., Hoyer, D., Hynes, N. A., Inui, K.-I., Ishii, S., Jacobson, K. A., Jarvis, G. E., Jarvis, M. F., Jensen, R., Jones, C. E., Jones, R. L., Kaibuchi, K., Kanai, Y., Kennedy, C., Kerr, I. D., Khan, A. A., Klienz, M. J., Kukkonen, J. P., Lapoint, J. Y., Leurs, R., Lingueglia, E., Lippiat, J., Lolait, S. J., Lummis, S. C. R., Lynch, J. W., MacEwan, D., Maguire, J. J., Marshall, I. L., May, J. M., McArdle, C. A., McGrath, J. C., Michel, M. C., Millar, N. S., Miller, L. J., Mitolo, V., Monk, P. N., Moore, P. K., Moorhouse, A. J., Mouillac, B., Murphy, P. M., Neubig, R. R., Neumaier, J., Niesler, B., Obaidat, A., Offermanns, S., Ohlstein, E., Panaro, M. A., Parsons, S., Pwrtwee, R. G., Petersen, J., Pin, J.-P., Poyner, D. R., Prigent, S., Prossnitz, E. R., Pyne, N. J., Pyne, S., Quigley, J. G., Ramachandran, R., Richelson, E. L., Roberts, R. E., Roskoski, R., Ross, R. A., Roth, M., Rudnick, G., Ryan, R. M., Said, S. I., Schild, L., Sanger, G. J., Scholich, K., Schousboe, A., Schulte, G., Schulz, S., Serhan, C. N., Sexton, P. M., Sibley, D. R., Siegel, J. M., Singh, G., Sitsapesan, R., Smart, T. G., Smith, D. M., Soga, T., Stahl, A., Stewart, G., Stoddart, L. A., Summers, R. J., Thorens, B., Thwaites, D. T., Toll, L., Traynor, J. R., Usdin, T. B., Vandenberg, R. J., Villalon, C., Vore, M., Waldman, S. A., Ward, D. T., Willars, G. B., Wonnacott, S. J., Wright, E., Ye, R. D., Yonezawa, A., and Zimmermann, M. (2013) The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: overview. *Br. J. Pharmacol.* **170**, 1449–58
362. Beeton, C., Wulff, H., Barbaria, J., Clot-Faybesse, O., Pennington, M., Bernard, D., Cahalan, M. D., Chandy, K. G., and Béraud, E. (2001) Selective blockade of T lymphocyte K(+) channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 13942–7

363. Beeton, C., Wulff, H., Standifer, N. E., Azam, P., Mullen, K. M., Pennington, M. W., Kolski-Andreaco, A., Wei, E., Grino, A., Counts, D. R., Wang, P. H., LeeHealey, C. J., S Andrews, B., Sankaranarayanan, A., Homerick, D., Roeck, W. W., Tehranzadeh, J., Stanhope, K. L., Zimin, P., Havel, P. J., Griffey, S., Knaus, H.-G., Nepom, G. T., Gutman, G. A., Calabresi, P. A., and Chandy, K. G. (2006) Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 17414–9
364. Azam, P., Sankaranarayanan, A., Homerick, D., Griffey, S., and Wulff, H. (2007) Targeting effector memory T cells with the small molecule Kv1.3 blocker PAP-1 suppresses allergic contact dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 1419–29
365. Feske, S., Wulff, H., and Skolnik, E. Y. (2015) Ion channels in innate and adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **33**, 291–353
366. DeCoursey, T. E., Chandy, K. G., Gupta, S., and Cahalan, M. D. Voltage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature* **307**, 465–8
367. Chandy, K. G., DeCoursey, T. E., Cahalan, M. D., McLaughlin, C., and Gupta, S. (1984) Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* **160**, 369–85
368. Lewis, R. S., and Cahalan, M. D. (1995) Potassium and calcium channels in lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **13**, 623–53
369. Feske, S., Skolnik, E. Y., and Prakriya, M. (2012) Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 532–47
370. Wulff, H., Calabresi, P. A., Allie, R., Yun, S., Pennington, M., Beeton, C., and Chandy, K. G. (2003) The voltage-gated Kv1.3 K⁽⁺⁾ channel in effector memory T cells as new target for MS. *J. Clin. Invest.* **111**, 1703–13
371. Breland, A. E., and Currier, R. D. (1983) Scorpion venom and multiple sclerosis. *Lancet* **2**, 1021
372. Chi, V., Pennington, M. W., Norton, R. S., Tarcha, E. J., Londono, L. M., Sims-Fahey, B., Upadhyay, S. K., Lakey, J. T., Iadonato, S., Wulff, H., Beeton, C., and Chandy, K. G. (2012) Development of a sea anemone toxin as an immunomodulator for therapy of autoimmune diseases. *Toxicon* **59**, 529–46
373. Pennington, M. W., Beeton, C., Galea, C. A., Smith, B. J., Chi, V., Monaghan, K. P., Garcia, A., Rangaraju, S., Giuffrida, A., Plank, D., Crossley, G., Nugent, D., Khaytin, I., Lefievre, Y., Peshenko, I., Dixon, C., Chauhan, S., Orzel, A., Inoue, T., Hu, X., Moore, R. V., Norton, R. S., and Chandy, K. G. (2009) Engineering a stable and selective peptide blocker of the Kv1.3 channel in T lymphocytes. *Mol. Pharmacol.* **75**, 762–73
374. Beeton, C., Pennington, M. W., and Norton, R. S. (2011) Analogs of the sea anemone potassium channel blocker ShK for the treatment of autoimmune diseases. *Inflamm. Allergy Drug Targets* **10**, 313–21
375. Mouhat, S., Visan, V., Ananthakrishnan, S., Wulff, H., Andreotti, N., Grissmer, S., Darbon, H., De Waard, M., and Sabatier, J.-M. (2005) K⁺ channel types targeted by

- synthetic OSK1, a toxin from *Orthochirus scrobiculosus* scorpion venom. *Biochem. J.* **385**, 95–104
376. Koo, G. C., Blake, J. T., Talento, A., Nguyen, M., Lin, S., Sirotina, A., Shah, K., Mulvany, K., Hora, D., Cunningham, P., Wunderler, D. L., McManus, O. B., Slaughter, R., Bugianesi, R., Felix, J., Garcia, M., Williamson, J., Kaczorowski, G., Sigal, N. H., Springer, M. S., and Feeney, W. (1997) Blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses in vivo. *J. Immunol.* **158**, 5120–8
 377. Leonard, R. J., Garcia, M. L., Slaughter, R. S., and Reuben, J. P. (1992) Selective blockers of voltage-gated K⁺ channels depolarize human T lymphocytes: mechanism of the antiproliferative effect of charybdotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 10094–8
 378. Bradding, P., and Wulff, H. (2009) The K⁺ channels K(Ca)3.1 and K(v)1.3 as novel targets for asthma therapy. *Br. J. Pharmacol.* **157**, 1330–9
 379. Koshy, S., Huq, R., Tanner, M. R., Atik, M. A., Porter, P. C., Khan, F. S., Pennington, M. W., Hanania, N. A., Corry, D. B., and Beeton, C. (2014) Blocking KV1.3 channels inhibits Th2 lymphocyte function and treats a rat model of asthma. *J. Biol. Chem.* **289**, 12623–32
 380. Grgic, I., Wulff, H., Eichler, I., Flothmann, C., Köhler, R., and Hoyer, J. Blockade of T-lymphocyte KCa3.1 and Kv1.3 channels as novel immunosuppression strategy to prevent kidney allograft rejection. *Transplant. Proc.* **41**, 2601–6
 381. Schmitt, N., Grunnet, M., and Olesen, S.-P. (2014) Cardiac potassium channel subtypes: new roles in repolarization and arrhythmia. *Physiol. Rev.* **94**, 609–53
 382. Kass, R. S. (2005) The channelopathies: novel insights into molecular and genetic mechanisms of human disease. *J. Clin. Invest.* **115**, 1986–9
 383. Robbins, C. A., and Tempel, B. L. (2012) Kv1.1 and Kv1.2: similar channels, different seizure models. *Epilepsia* **53 Suppl 1**, 134–41
 384. Maljevic, S., and Lerche, H. (2014) Potassium channel genes and benign familial neonatal epilepsy. *Prog. Brain Res.* **213**, 17–53
 385. Guglielmi, L., Servettini, I., Caramia, M., Catacuzzeno, L., Franciolini, F., D'Adamo, M. C., and Pessia, M. (2015) Update on the implication of potassium channels in autism: K(+) channelautism spectrum disorder. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 34
 386. Huber, S. M. (2013) Oncochannels. *Cell Calcium* **53**, 241–55
 387. Tsantoulas, C., and McMahon, S. B. (2014) Opening paths to novel analgesics: the role of potassium channels in chronic pain. *Trends Neurosci.* **37**, 146–58
 388. Ocaña, M., Cendán, C. M., Cobos, E. J., Entrena, J. M., and Baeyens, J. M. (2004) Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. *Eur. J. Pharmacol.* **500**, 203–19
 389. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., and Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725–9

390. Saitou, N., and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406–25
391. Kuipers, B. J. H., and 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. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 5445–51
392. Chudakov, D. M., Matz, M. V, Lukyanov, S., and Lukyanov, K. A. (2010) Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol. Rev.* **90**, 1103–63
393. Kozlov, S., Malyavka, A., McCutchen, B., Lu, A., Schepers, E., Herrmann, R., and Grishin, E. (2005) A novel strategy for the identification of toxinlike structures in spider venom. *Proteins* **59**, 131–40
394. Zhu, S., Peigneur, S., Gao, B., Luo, L., Jin, D., Zhao, Y., and Tytgat, J. (2011) Molecular diversity and functional evolution of scorpion potassium channel toxins. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, M110.002832
395. Gao, B., Peigneur, S., Dalziel, J., Tytgat, J., and Zhu, S. (2011) Molecular divergence of two orthologous scorpion toxins affecting potassium channels. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **159**, 313–21
396. Filippov, A. K., Kozlov, S. A., Pluzhnikov, K. A., Grishin, E. V, and Brown, D. A. (1996) M-type K⁺ current inhibition by a toxin from the scorpion *Buthus eupeus*. *FEBS Lett.* **384**, 277–80
397. Romi-Lebrun, R., Lebrun, B., Martin-Eauclaire, M. F., Ishiguro, M., Escoubas, P., Wu, F. Q., Hisada, M., Pongs, O., and Nakajima, T. (1997) Purification, characterization, and synthesis of three novel toxins from the Chinese scorpion *Buthus martensi*, which act on K⁺ channels. *Biochemistry* **36**, 13473–82
398. Grishin, E. V., Korolkova, Y. V., Kozlov, S. A., Lipkin, A. V., Nosyreva, E. D., Pluzhnikov, K. A., Sukhanov, S. V., and Volkova, T. M. (1996) Structure and function of the potassium channel inhibitor from black scorpion venom. *Pure Appl. Chem.* **68**
399. Jaravine, V. A., Nolde, D. E., Reibarkh, M. J., Korolkova, Y. V, Kozlov, S. A., Pluzhnikov, K. A., Grishin, E. V, and Arseniev, A. S. (1997) Three-dimensional structure of toxin OSK1 from *Orthochirus scrobiculosus* scorpion venom. *Biochemistry* **36**, 1223–32
400. Kirsch, G. E., Shieh, C. C., Drewe, J. A., Vener, D. F., and Brown, A. M. (1993) Segmental exchanges define 4-aminopyridine binding and the inner mouth of K⁺ pores. *Neuron* **11**, 503–12
401. Robert W Stackman, J. (2005) *The Synaptic Organization of the Brain*. Fifth Edition. Edited by Gordon M Shepherd. *Q. Rev. Biol.* **80**, 502
402. McNamara, N. M., Muniz, Z. M., Wilkin, G. P., and Dolly, J. O. (1993) Prominent location of a K⁺ channel containing the alpha subunit Kv 1.2 in the basket cell nerve terminals of rat cerebellum. *Neuroscience* **57**, 1039–45

403. Abbas, N., Belghazi, M., Abdel-Mottaleb, Y., Tytgat, J., Bougis, P. E., and Martin-Eauclaire, M.-F. (2008) A new Kaliotoxin selective towards Kv1.3 and Kv1.2 but not Kv1.1 channels expressed in oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **376**, 525–30
404. Zeng, X. C., Peng, F., Luo, F., Zhu, S. Y., Liu, H., and Li, W. X. (2001) Molecular cloning and characterization of four scorpion K(+)-toxin-like peptides: a new subfamily of venom peptides (alpha-KTx14) and genomic analysis of a member. *Biochimie* **83**, 883–9
405. Zeng, X.-C., Luo, F., and Li, W.-X. (2006) Molecular dissection of venom from Chinese scorpion *Mesobuthus martensii*: identification and characterization of four novel disulfide-bridged venom peptides. *Peptides* **27**, 1745–54
406. Luna-Ramírez, K., Quintero-Hernández, V., Vargas-Jaimes, L., Batista, C. V. F., Winkel, K. D., and Possani, L. D. (2013) Characterization of the venom from the Australian scorpion *Urodacus yaschenkoi*: Molecular mass analysis of components, cDNA sequences and peptides with antimicrobial activity. *Toxicon* **63**, 44–54
407. Mille, B. G., Peigneur, S., Diego-García, E., Predel, R., and Tytgat, J. (2014) Partial transcriptomic profiling of toxins from the venom gland of the scorpion *Parabuthus stridulus*. *Toxicon* **83**, 75–83
408. Abdel-Rahman, M. A., Quintero-Hernandez, V., and Possani, L. D. (2013) Venom proteomic and venomous glands transcriptomic analysis of the Egyptian scorpion *Scorpio maurus palmatus* (Arachnida: Scorpionidae). *Toxicon* **74**, 193–207
409. Almeida, D. D., Scortecci, K. C., Kobashi, L. S., Agnez-Lima, L. F., Medeiros, S. R. B., Silva-Junior, A. A., Junqueira-de-Azevedo, I. de L. M., and Fernandes-Pedrosa, M. de F. (2012) Profiling the resting venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus* through a transcriptomic survey. *BMC Genomics* **13**, 362
410. Mozhayeva, G. N., Naumov, A. P., Nosyreva, E. D., and Grishin, E. V (1980) Potential-dependent interaction of toxin from venom of the scorpion *Buthus eupeus* with sodium channels in myelinated fibre: voltage clamp experiments. *Biochim. Biophys. Acta* **597**, 587–602
411. Wang, X., Gao, B., and Zhu, S. (2016) A single-point mutation enhances dual functionality of a scorpion toxin. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **179**, 72–8
412. Shieh, C. C., and Kirsch, G. E. (1994) Mutational analysis of ion conduction and drug binding sites in the inner mouth of voltage-gated K⁺ channels. *Biophys. J.* **67**, 2316–25
413. Rodríguez de la Vega, R. C., Merino, E., Becerril, B., and Possani, L. D. (2003) Novel interactions between K⁺ channels and scorpion toxins. *Trends Pharmacol. Sci.* **24**, 222–7
414. Darbon, H., Blanc, E., and Sabatier, J. M. (1999) *Three-dimensional structure of scorpion toxins: towards a new model of interaction with potassium channels. In Perspectives in Drug Discovery and Design: Animal Toxins and Potassium Channels, vol. 15/16 (Darbon, H. and Sabatier, J. M., eds.), Kluwer/Escom, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*

415. Dai, L., Wu, J. J., Gu, Y. H., Lan, Z. D., Ling, M. H., and Chi, C. W. (2000) Genomic organization of three novel toxins from the scorpion *Buthus martensi* Karsch that are active on potassium channels. *Biochem. J.* **346 Pt 3**, 805–9
416. Holaday, S. K., Martin, B. M., Fletcher, P. L., and Krishna, N. R. (2000) NMR solution structure of butantoxin. *Arch. Biochem. Biophys.* **379**, 18–27
417. Garcia, M. L., Gao, Y., McManus, O. B., and Kaczorowski, G. J. (2001) Potassium channels: from scorpion venoms to high-resolution structure. *Toxicon* **39**, 739–48
418. Catterall, W. A. (1980) Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **20**, 15–43
419. O'Brien, R. D., Eldefrawi, M. E., and Eldefrawi, A. T. (1972) Isolation of acetylcholine receptors. *Annu. Rev. Pharmacol.* **12**, 19–34
420. Olivera, B. M., Miljanich, G. P., Ramachandran, J., and Adams, M. E. (1994) Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 823–67
421. Bohlen, C. J., Chesler, A. T., Sharif-Naeini, R., Medzihradzky, K. F., Zhou, S., King, D., Sánchez, E. E., Burlingame, A. L., Basbaum, A. I., and Julius, D. (2011) A heteromeric Texas coral snake toxin targets acid-sensing ion channels to produce pain. *Nature* **479**, 410–4
422. Chen, L., Dürr, K. L., and Gouaux, E. (2014) X-ray structures of AMPA receptor-cone snail toxin complexes illuminate activation mechanism. *Science (80-.)*. **345**, 1021–6
423. Bacongus, I., and Gouaux, E. (2012) Structural plasticity and dynamic selectivity of acid-sensing ion channel-spider toxin complexes. *Nature* **489**, 400–5
424. Aoki, Y., Takahashi, Y., Ohtori, S., Moriya, H., and Takahashi, K. (2004) Distribution and immunocytochemical characterization of dorsal root ganglion neurons innervating the lumbar intervertebral disc in rats: a review. *Life Sci.* **74**, 2627–42
425. Sailer, C. A., Kaufmann, W. A., Marksteiner, J., and Knaus, H.-G. (2004) Comparative immunohistochemical distribution of three small-conductance Ca²⁺-activated potassium channel subunits, SK1, SK2, and SK3 in mouse brain. *Mol. Cell. Neurosci.* **26**, 458–69
426. Hovius, R. (2013) Characterization and validation of fluorescent receptor ligands: a case study of the ionotropic serotonin receptor. *Methods Mol. Biol.* **995**, 161–78
427. Hone, A. J., Whiteaker, P., Mohn, J. L., Jacob, M. H., and McIntosh, J. M. (2010) Alexa Fluor 546-ArIB[V11L;V16A] is a potent ligand for selectively labeling alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurochem.* **114**, 994–1006
428. Nørager, N. G., Jensen, C. B., Rathje, M., Andersen, J., Madsen, K. L., Kristensen, A. S., and Strømgaard, K. (2013) Development of potent fluorescent polyamine toxins and application in labeling of ionotropic glutamate receptors in hippocampal neurons. *ACS Chem. Biol.* **8**, 2033–41

429. Williams, M. R., Fuchs, J. R., Green, J. T., and Morielli, A. D. (2012) Cellular mechanisms and behavioral consequences of Kv1.2 regulation in the rat cerebellum. *J. Neurosci.* **32**, 9228–37
430. Quintero-Hernández, V., Jiménez-Vargas, J. M., Gurrola, G. B., Valdivia, H. H., and Possani, L. D. (2013) Scorpion venom components that affect ion-channels function. *Toxicon* **76**, 328–42
431. Green, W. N. (1999) Ion channel assembly: creating structures that function. *J. Gen. Physiol.* **113**, 163–70
432. Mordvintsev, D. Y., Polyak, Y. L., Levtsova, O. V, Tourleigh, Y. V, Kasheverov, I. E., Shaitan, K. V, Utkin, Y. N., and Tsetlin, V. I. (2005) A model for short alpha-neurotoxin bound to nicotinic acetylcholine receptor from *Torpedo californica*: comparison with long-chain alpha-neurotoxins and alpha-conotoxins. *Comput. Biol. Chem.* **29**, 398–411
433. Wang, J., Yarov-Yarovoy, V., Kahn, R., Gordon, D., Gurevitz, M., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (2011) Mapping the receptor site for alpha-scorpion toxins on a Na⁺ channel voltage sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 15426–31
434. Zhang, J. Z., Yarov-Yarovoy, V., Scheuer, T., Karbat, I., Cohen, L., Gordon, D., Gurevitz, M., and Catterall, W. A. (2012) Mapping the interaction site for a β -scorpion toxin in the pore module of domain III of voltage-gated Na⁽⁺⁾ channels. *J. Biol. Chem.* **287**, 30719–28