

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

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва – 2016

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

**Научный руководитель:**

Василевский Александр Александрович, кандидат химических наук

**Официальные оппоненты:**

Семьянов Алексей Васильевич, доктор биологических наук, профессор, директор НИИ Нейронаук Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, руководитель лаборатории внесинаптической передачи.

Никулин Алексей Донатович, кандидат химических наук, заместитель директора Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института белка Российской академии наук.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук.

Защита состоится 14 декабря 2016 года в 10-00 часов на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на официальном сайте ([www.ibch.ru](http://www.ibch.ru)) Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 2016 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета



д.ф.-м.н. В.А. Олейников

## **Общая характеристика работы**

### **Актуальность проблемы**

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 структуры и функции 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 *Mesobuthus eupeus* и

*Orthochirus 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.

### **Научная новизна работы**

- 1) Создана интерактивная база данных токсинов из яда скорпионов, действующих на  $K^+$  каналы (Kalium, [www.kaliumdb.org](http://www.kaliumdb.org)), содержащая исчерпывающую информацию об этих соединениях. Ранее подобный ресурс был недоступен исследователям.
- 2) С помощью комбинации транскриптомного и протеомного подходов в яде скорпионов *M. eurus* и *O. scrobiculosus* были идентифицированы шесть новых пептидных блокаторов  $K^+$  каналов. Установлена первичная структура и произведена детальная физиологическая характеристика новых токсинов.
- 3) Впервые создана химера флуоресцентного белка и токсина, действующего на ионный канал, и продемонстрированы возможные способы применения нового биомолекулярного инструмента (визуализация  $K^+$  каналов на поверхности клеток и срезах тканей и использование химеры в скрининговых технологиях).

### **Практическая значимость работы**

Полученные данные имеют высокую практическую значимость и могут быть использованы в разных областях биорганической химии, биохимии и фармакологии. Во-первых, база данных Kalium может быть использована как инструмент поиска и подбора блокаторов  $K^+$  каналов с заданными свойствами. Во-вторых, новые токсины из яда скорпионов *M. eurus* и *O. scrobiculosus* могут найти применение в качестве прототипов лекарственных препаратов для заболеваний, в которые вовлечены  $K^+$  каналы. Также эти пептиды могут быть использованы для дальнейшего фундаментального изучения структурно-функциональных основ работы  $K^+$  каналов. В-третьих, химера флуоресцентного белка и токсина скорпиона может использоваться в качестве зонда для детекции развития некоторых аутоиммунных заболеваний, а также как новый биомолекулярный инструмент для визуализации  $K^+$  каналов на срезах тканей и на поверхности клеток.

## **Апробация работы**

Основные материалы диссертации были представлены на конференции «Молекулярная медицина и постгеномная биология» (Москва, Россия, 2012), III международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, Россия, 2012), XVI международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, Россия, 2012), VI и VII Российских симпозиумах «Белки и пептиды» (Уфа, Россия, 2013 и Новосибирск, Россия, 2015), IX конгрессе Европейской ассоциации биофизического общества (Лиссабон, Португалия, 2013), 38, 39 и 40 конгрессах Федерации европейских биохимических обществ (Санкт-Петербург, Россия, 2013, Париж, Франция, 2014 и Берлин, Германия, 2015), XXVI Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, Россия, 2014), XII конгрессе Панамериканской секции Международного общества токсикологии (Майями-Бич, США, 2016).

## **Публикации**

По теме диссертационной работы опубликовано пять статей в международных научных журналах.

## **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа изложена на 160 страницах, содержит 51 рисунок и 17 таблиц, имеет традиционную структуру и состоит из следующих разделов: списка сокращений, введения, цели и задач работы, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов, благодарностей и списка используемой литературы, включающего 434 источника.

## **Содержание работы**

### **1.1 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). В основе классификации КТх лежит единая система, разработанная Я. Титгатом и Л. Поссани. Классификация базируется на структурно-функциональных особенностях токсинов, а в названии каждого КТх используется следующий код:  $x$ -КТх  $y.z$ , где  $x$  – семейство, базирующееся на структуре ( $\alpha$ ,  $\beta$  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  $\alpha$ -КТх 1.1 (семейство  $\alpha$ -КТх, подсемейство 1, первый представитель).

### 1.1.1 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  $\beta$ -КТх, выделение токсинов с мотивом ИСК в новое семейство –  $\lambda$ -КТх. Данные об аминокислотных последовательностях КТх, ссылки на разрешенные пространственные структуры токсинов и локализация дисульфидных связей были получены из базы данных UniProt.

Токсином, входящим в семейство  $\beta$ -КТх, были даны соответствующие названия (по аналогии с  $\alpha$ -КТх):  $\beta$ -КТх 1.1,  $\beta$ -КТх 1.2 и т.д. Новое семейство  $\lambda$ -КТх объединило токсины с мотивом ИСК.

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).

### 1.1.2 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 1**):

**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.

Для каждого токсина детальная информация представлена в «карточке токсина». 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.

**Last Modified (Последнее изменение)** – дата последнего изменения записи.

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

Organism	Name	Synonyms	UniProt ID	Sequence	PDB	Mass	Pub. Date	Activity
Leirus quinquestriatus hebraeus	α-KTx 1.1	ChTX, ChTX-Lq1, ...	P13487	EFINVSCTISREKNSVQRLNHTSRGKQDNKPKSGLYS	1BAH, 1CMR	4295.05	1990-01-01	Shaker, Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.6, Kv2.1, K
Leirus quinquestriatus hebraeus	α-KTx 1.2	ChTX-Lq2, ChTX-d...	P45628	EFIQESCTASHKNSICQRLNHTSRGKQDNKPKSGLYS	1LIR	4335.08	1995-11-01	Kv1, KCa1.1
Mesobuthus tamulus	α-KTx 1.3	IbTx, Iberiotoxin	P24663	EFIDVDCSTVSKKNSVCKDLDFGVDRAKQNGKPKSGLYS		4230.02	1992-03-01	KCa1.1
Mesobuthus martensii	α-KTx 1.5	BmTX1, Neurotoxin...	Q9NII6	EFIDVDCSTGSKKNSVCKDLDFGVDRAKQNGKPKSGLYS	1BIG	4169.04	2001-12-19	Kv1, Kv1.3, KCa1.1
Mesobuthus martensii	α-KTx 1.6	BmTX2, Neurotoxin...	Q9NII5	EFINVSCTASSSKNSVCKDLDFGVDRAKQNGKPKSGLYS	2BMT	4178.97	2002-01-23	Kv1, Kv1.3, Kv1.1, KCa1.1
Parabuthus transvaalicus	α-KTx 1.10	PBTx3, Parabutoxin-3	P83112	EVIKRCSTSSKNSVCKDLDFGVDRAKQNGKPKSGLYS		4274.23	2001-12-19	Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.1.1
Centruroides noxius	α-KTx 1.11	SloTx, Slotoxin	P0C182	TFIDVDCSTVSKKNSVCKDLDFGVDRAKQNGKPKSGLYS		4085.98	2006-03-21	KCa1.1
Mesobuthus eupeus	α-KTx 1.16	Toxin MeKTx11-1	COHJQ8	EFIDVDCSTGSKKNSVCKDLDFGVDRAKQNGKPKSGLYS		4221.16	2015-05-27	Kv1.1
Mesobuthus eupeus	α-KTx 1.17	Toxin MeKTx11-3	COHJQ7	EFIDVDCSTVSKKNSVCKDLDFGVDRAKQNGKPKSGLYS		4253.21	2015-05-27	Kv1.1
Centruroides noxius	α-KTx 2.1	NTx, Noxiustoxin, ...	P08815	TIINVKCTSPKCKLRFCKDLDFGVDRAKQNGKPKSGLYS	1SXM	4195.06	1988-11-01	Shaker, Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.5, KCa1.1
Centruroides margaritatus	α-KTx 2.2	MgTX, Margatoxin	P40755	TIINVKCTSPKCKLRFCKDLDFGVDRAKQNGKPKSGLYS	1MTX	4179.11	1995-02-01	Shaker, Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3
Centruroides limpidus limpidus	α-KTx 2.3	ClITx1, Toxin I, To...	P45629	TIINVKCTSPKCKLRFCKDLDFGVDRAKQNGKPKSGLYS		4191.06	1995-11-01	Kv1
Centruroides noxius	α-KTx 2.4	NTx-2, NTx2, Noxi...	Q8TXD1	TIINVKCTSPKCKLRFCKDLDFGVDRAKQNGKPKSGLYS		4183.05	2003-09-26	Kv1
Centruroides limbatus	α-KTx 2.5	HgTX1, Hongotoxin-1	P59847	TVIDVDCSTVSKKNSVCKDLDFGVDRAKQNGKPKSGLYS	1HLY	4220.20	2003-09-19	Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.6
Centruroides limpidus limpidus	α-KTx 2.7	ClITx2, Toxin II, To...	P45630	TVIDVDCSTVSKKNSVCKDLDFGVDRAKQNGKPKSGLYS		3905.82	1995-11-01	Kv1
Centruroides elegans	α-KTx 2.8	Toxin Ce1	P0C161	TIINVKCTSPKCKLRFCKDLDFGVDRAKQNGKPKSGLYS		4254.17	2006-03-07	Kv1.3
Centruroides elegans	α-KTx 2.9	Toxin Ce2	P0C162	TIINVKCTSPKCKLRFCKDLDFGVDRAKQNGKPKSGLYS		4267.22	2006-03-07	Kv1.3

**Рисунок 1.** 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.

**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 полуингибирования ( $IC_{50}$ ) 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, мыши 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.

## **1.2 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.

Яд скорпиона *Euscorpis mingrelicus* и пауков *Eresus niger* и *Latrodectus 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 (*Androctonus amoreuxi*, *Buthacus arenicola*, *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, *M. eureus* 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. eureus* и *O. scrobiculosus*.

## **1.3 Анализ транскриптома ядовитых желез скорпионов *M. eureus* и *O. scrobiculosus***

### **1.3.1 Составление библиотек кДНК из ядовитых желез *M. eureus* и *O. scrobiculosus***

Библиотеки нуклеотидных последовательностей кДНК из ядовитых желез *M. eureus* и *O. scrobiculosus* были получены с использованием традиционного подхода. 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. eureus* 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 CS $\alpha$ / $\beta$ , 4 последовательности для мотива ICK и 4 последовательности для мотива CS $\alpha$ / $\alpha$  2(S-S) (всего последовательностей, удовлетворивших поисковым условиям, – 252). Для *O. scrobiculosus* были найдены последовательности, соответствующие только фолду CS $\alpha$ / $\beta$  (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 $\alpha$ / $\beta$ . У *O. scrobiculosus* все 28 последовательностей соответствовали мотиву CS $\alpha$ / $\beta$ . Для каждого скорпиона с помощью BLAST последовательности, соответствующие фолду CS $\alpha$ / $\beta$ , 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> каналы, 2 – антимикробные пептиды и 7 последовательностей, не имеющих значимого сходства с известными токсинами. Последовательности, удовлетворяющие мотивам CS $\alpha$ / $\alpha$  2(S-S) и типа Кунитца не были найдены ни в одном из транскриптомов.

### **1.3.2 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 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<sup>+</sup> каналы.

Большинство МеКТх – представители описанных подсемейств КТх, таких как  $\alpha$ -КТх 1,  $\beta$ -КТх 1,  $\gamma$ -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. Предполагаемые предшественники токсинов были названы аналогичным образом с рМеКТх: рОсКТх. Для анализа последовательностей рОсКТх использовались подходы, идентичные подходам, описанным выше.

## **1.4 Выделение и характеристика блокаторов $K^+$ каналов из цельных ядов скорпионов**

### **1.4.1 Выделение новых КТх из яда *M. eureus* с помощью хроматографических методов**

Цельный яд *M. eureus* 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 2 А**). Эти фракции были протестированы на способность связываться с гибридными  $KcsA-K_v1.1$ , и активность была обнаружена только во фракции II (**Рисунок 2 В**). Отрицательный результат, полученный при тестировании фракций I и III, говорит о том, что они не содержат высоко аффинных лигандов  $K_v1.1$ .

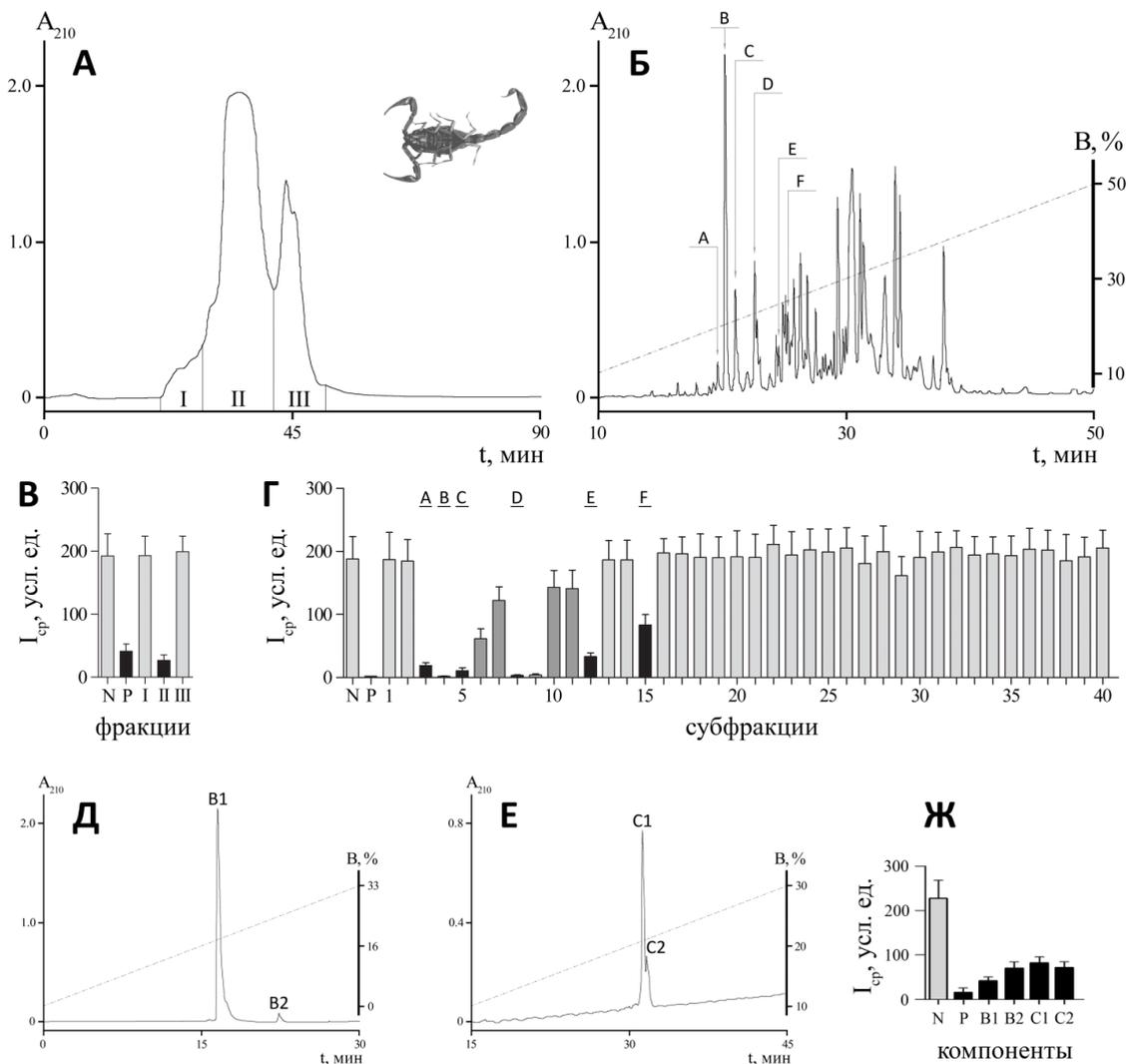
Для выделения активных компонентов фракция II была подвержена разделению с помощью ОФ-ВЭЖХ (**Рисунок 2 Б**). В результате было получено 40 отдельных субфракций, которые также были протестированы на  $KcsA-K_v1.1$  (**Рисунок 2 Г**). Шесть субфракций (А–F) вытесняли R-AgTx2 из комплексов с гибридными каналами, следовательно содержали потенциальные активные компоненты.

Второй раунд ОФ-ВЭЖХ позволил выделить активные компоненты в индивидуальном виде. Каждая из субфракций А, D, E и F содержала единственный активный компонент. В субфракции С (**Рисунок 2 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 разделения (**Рисунок 2 Д, Ж**). В результате восемь блокаторов  $K_v1.1$  были обнаружены и выделены из яда *M. eureus*.

Гомогенность препаратов активных компонентов А, В1, В2, С1, С2, D, Е и F была подтверждена с помощью аналитической хроматографии и масс-спектрометрии.

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

Ранее в яде скорпиона *M. eurus* были найдены следующие токсины: три  $\alpha$ -КТх (MeuКТх-1, P86400; MeuКТх-3, P86396; и MeuТх3В, D3JXM1), один  $\beta$ -КТх (MeuТХК $\beta$ 1, A9XE60), один  $\gamma$ -КТх (ВеКм-1, Q9ВКВ7) и один  $\lambda$ -КТх ( $\lambda$ -MeuТх-1, P86399). Поскольку  $\beta$ -КТх и  $\lambda$ -КТх – очень слабые ингибиторы  $K_v$ , а  $\gamma$ -КТх – блокаторы определенного типа  $K_v$



**Рисунок 2.** 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<sub>v</sub>1.1 с R-AgTx2 на поверхности сферопластов. Чистый буфер (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).

(K<sub>v</sub>11 или ERG), данное исследование было сфокусировано на α-КТх – семействе наиболее представленных и высокоаффинных лигандов K<sub>v</sub>. Всего пять новых и три уже описанных пептида было идентифицировано в яде *M. eurus* с помощью комбинации методов ОФ-ВЭЖХ, масс-спектрометрии и флуоресцентного подхода (Таблица 2). Три известные α-КТх (MeuКТх-1, MeuКТх-3 и MeuТх3В) 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 (МеКТх1-2) – очень близкий гомолог MeuКТх-1 с двумя аминокислотными заменами (Е8Р и D20Е), а компонент С1 (МеКТх13-3) имеет идентичную аминокислотную последовательность с токсином, выделенным из родственного вида скорпиона *Mesobuthus martensii* (ВмКТХ, Q9NII7). Разница в один аминокислотный остаток между МеКТх13-3 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 1; все КТх были зарегистрированы в базе данных UniProt.

**Таблица 1.** Токсины, действующие на K<sub>v</sub>, которые были выделены из яда *M. eurus*. ○ – компоненты были идентифицированы впервые в этой работе, ● – ранее и в этой работе. Z – остаток пироглутаминовой кислоты. – NH<sub>2</sub> – амидирование.

Фракция	Название	ID	Аминокислотная последовательность	Мм	
A	1○	МеКТх13-2	C0HJQ4	REIPVKCKGSKQCLQSCKEAGMTYGKCMNGKCNCTPK-NH <sub>2</sub>	4047
B	1●	MeuКТх-1	P86400	VSCEDCPEHCATKDKQRAKCDNDKCVCEPK	3250
	2○	МеКТх1-2	C0HJQ5	VSCEDCPPHCATKDKQRAKCEENDKCVCEPK	3232
C	1○	МеКТх13-3	C0HJQ6	VGINVKCKHSGQCLKPKCKDAGMRFGKCINGKCDCTPK-NH <sub>2</sub>	3962
	2●	MeuКТх-3	P86396	VGINVKCKHSGQCLKPKCKDAGMRFGKCMNGKCDCTPK-NH <sub>2</sub>	3980
D	1○	МеКТх11-3	C0HJQ7	ZFTDVKCTVTKQCWVPCKKMFGRPNGKCMNGKCRCSY	4255
E	1○	МеКТх11-1	C0HJQ8	ZFTDVKCTGTQKQWVPCKKMFGRPNGKCMNGKCRCSY	4222
F	1●	MeuТх3В	F5CJW1	FGLIDVKCSASRECWVACCKKVTGSGQGKQNNQCRCY	4066

Токсины МеКТх11-3 и МеКТх11-1 (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.

Для токсинов МеКТх13-2, МеКТх13-3 и MeuКТх-3 из субфракций А и С было показано наличие C-концевого амидирования.

### **1.4.3 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<sub>v</sub>1.3. На первом этапе с помощью эксклюзионной хроматографии цельный яд был разделен на четыре отдельные фракции (I–IV, **Рисунок 3 А**). Фракции III и IV вытесняли R-AgTx2 из комплексов с KcsA-K<sub>v</sub>1.3, поэтому потенциально могли содержать активные молекулы (**Рисунок 3 Г**). Фракции III и IV были разделены с использованием ОФ-ВЭЖХ на 43 и 19 субфракций, соответственно (**Рисунок 3 Б, В**). Субфракции III-6 и IV-6 (отмеченные звездочкой на **Рисунке 3 Б, В**) конкурировали за сайт связывания с R-AgTx2 (**Рисунок 3 Д, Е**).

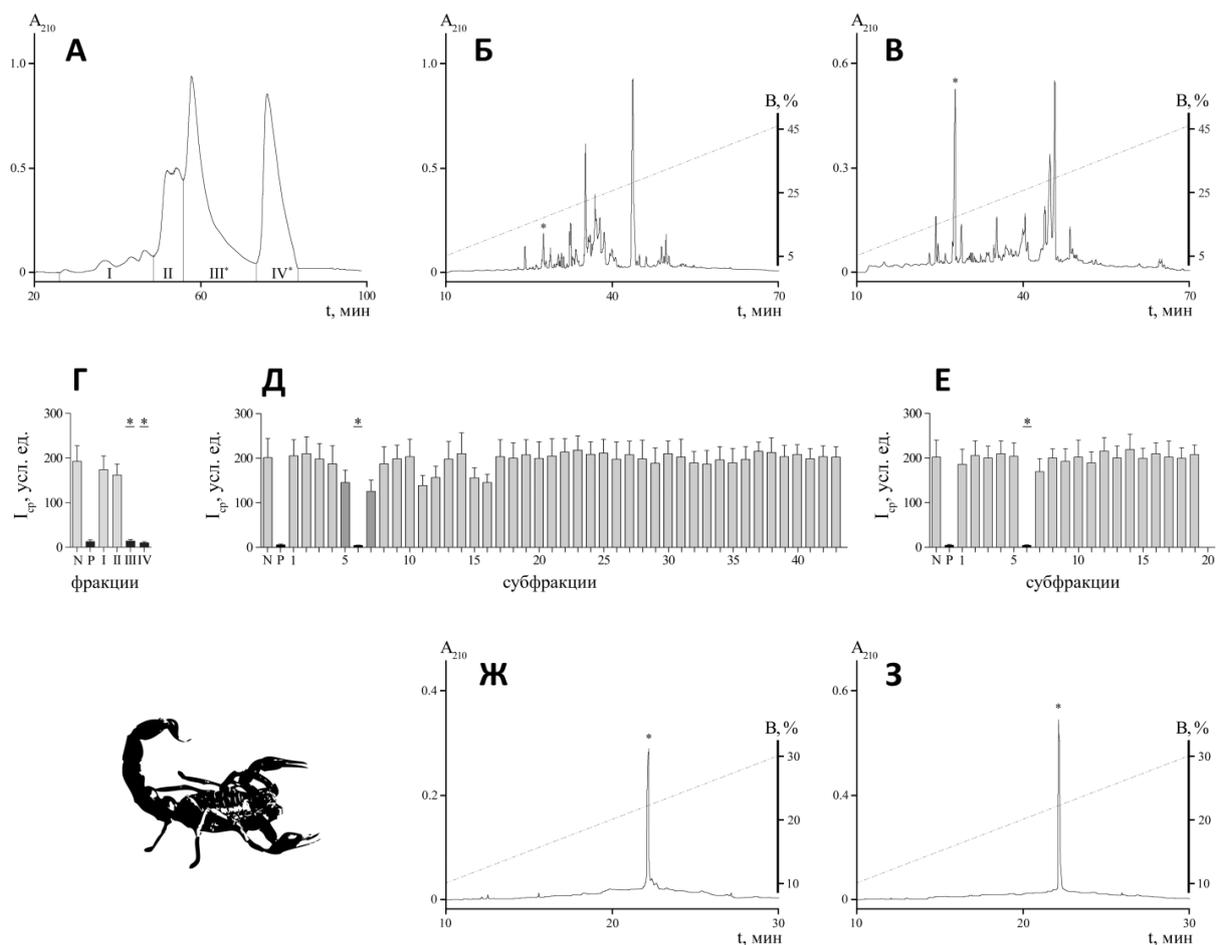
Основываясь на транскриптомных данных было предположено, что в яде *O. scrobiculosus* присутствует еще один КТх, активный на  $K_v$ , который не удалось идентифицировать с помощью флуоресцентной системы. Чтобы обнаружить потенциальный токсин, цельный яд был разделен непосредственно с помощью ОФ-ВЭЖХ.

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 (**Рисунок 4**).

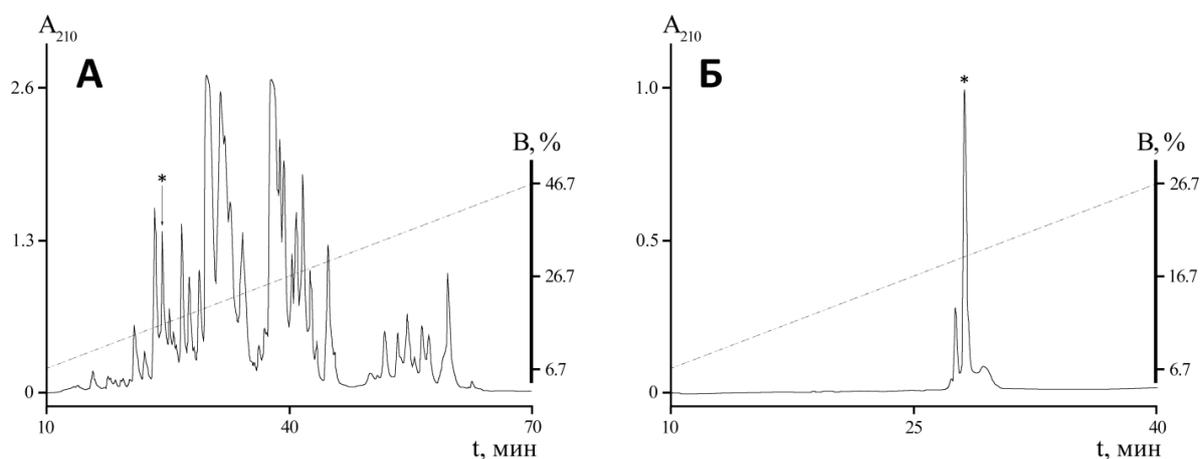
### **1.4.4 Анализ хроматографических профилей яда *O. scrobiculosus* и идентификация КТх**

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 деления 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 (**Таблица 2**).

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. Новый компонент получил название OSK3 (**Таблица 2**).



**Рисунок 3.** 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 C<sub>18</sub> в линейном градиенте концентрации ацетонитрила. Г, Д и Е – интенсивность флуоресценции комплексов KcsA-K<sub>v</sub>1.3 с R-AgTx2 на поверхности сферопластов. Чистый буфер (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.



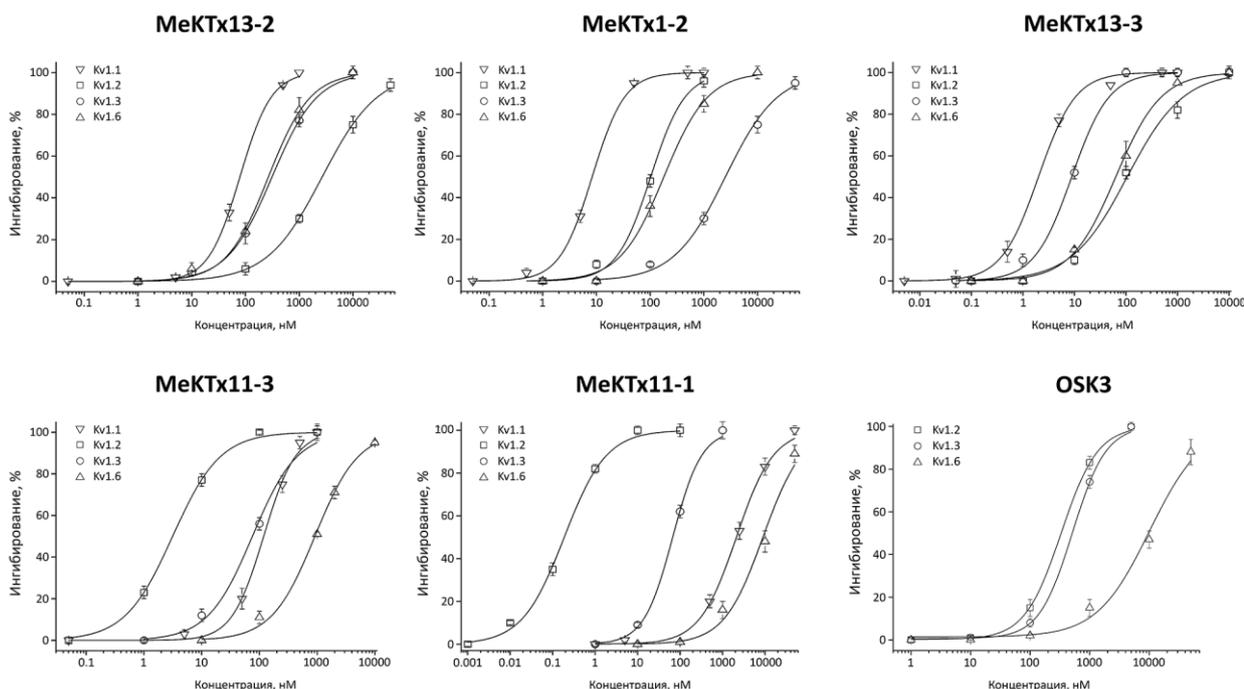
**Рисунок 4.** Выделение нового пептида (Os-9-2 или OSK3) из яда *O. scrobiculosus* с помощью двухстадийной ОФ-ВЭЖХ. А – разделение 1,5 мг цельного яда *O. scrobiculosus* на колонке Jupiter C<sub>5</sub>. Фракция с искомым молекулярной массой (Os-9) обозначена звездочкой. Б – выделение искомого компонента в индивидуальном виде (обозначен звездочкой) на колонке Vydac C<sub>18</sub>.

**Таблица 2.** 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	GVIIINVKCKISRQCLERCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	4205
IV	6●	OSK1	P55896	GVIIINVKCKISRQCLERCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	4205
Os-9	2○	OSK3	C0HK17	VSCEDCPENCSTQKARAKCDNDKCVCEPI	3207

### 1.4.5 Физиологическая характеристика новых токсинов

Для фармакологической характеристики новых токсинов были проведены электрофизиологические исследования на нескольких изоформах  $K_v$ , используя метод двухэлектродной фиксации потенциала. 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. eurus* (MeКТх13-2, MeКТх1-2, MeКТх13-3, MeКТх11-3 и MeКТх11-1) 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 5) и рассчитаны значения  $IC_{50}$  по отношению к каналам, на которых наблюдался эффект (Таблица 3).



**Рисунок 5.** Кривые «доза-ответ» для токсинов MeКТх13-2, MeКТх1-2, MeКТх13-3, MeКТх11-3, MeКТх11-1 и OSK3, полученные на  $K_v1.1-1.3$  и  $K_v1.6$ .

### 1.4.6 Классификация новых КТх, выделенных из яда *M. eurus* и *O. scrobiculosus*

Анализ аминокислотных последовательностей токсинов, выделенных из яда *M. eurus* и *O. scrobiculosus*, позволил однозначно отнести их к семейству  $\alpha$ -КТх гомологии. Токсины

MeКТх11-1 и MeКТх11-3 принадлежат подсемейству  $\alpha$ -КТх 1, куда входят такие известные представители, как ChТх и IbТх. Два ранее описанных токсина OSK1 и MeуКТх-3, а также новые полипептидные блокаторы MeКТх13-2 и MeКТх13-3 относятся к подсемейству  $\alpha$ -КТх 3. MeКТх1-2 и OSK3, а также ранее описанный MeуКТх-1 принадлежат к подсемейству коротких  $\alpha$ -КТх –  $\alpha$ -КТх 8. И наконец, ранее известный токсин MeуТх3В является представителем подсемейства  $\alpha$ -КТх 16.

**Таблица 3.** Значения IC<sub>50</sub> для новых токсинов, выделенных из *M. euryus* и *O. scrobiculosus*. OSK3 не показал эффекта на K<sub>v</sub>1.1 вплоть до концентрации 1 мкМ.

Токсин	K <sub>v</sub> 1.1 (IC <sub>50</sub> , нМ)	K <sub>v</sub> 1.2 (IC <sub>50</sub> , нМ)	K <sub>v</sub> 1.3 (IC <sub>50</sub> , нМ)	K <sub>v</sub> 1.6 (IC <sub>50</sub> , нМ)
<i>M. euryus</i>				
MeКТх13-2	90,3 ± 2,2	2677,7 ± 101,2	311,7 ± 19,7	266,3 ± 23,0
MeКТх1-2	8,5 ± 1,2	102,2 ± 12,1	2525,3 ± 422,0	180,0 ± 18,1
MeКТх13-3	1,9 ± 0,2	105,9 ± 14,6	8,9 ± 0,9	63,4 ± 4,5
MeКТх11-3	134,8 ± 10,1	3,1 ± 0,2	78,5 ± 11,2	911,0 ± 107,3
MeКТх11-1	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

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

## 1.5 Создание нового биомолекулярного инструмента на основе КТх для визуализации K<sup>+</sup> каналов

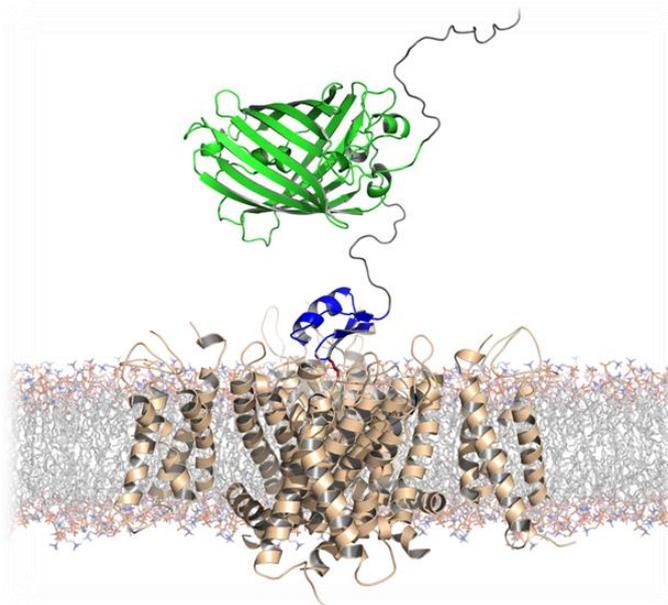
В соответствии с современной тенденцией использования токсинов для изучения ионных каналов, был разработан новый биомолекулярный инструмент на основе химеры флуоресцентного белка с КТх (**Рисунок 6**). Работа по получению химерного белка включала следующие этапы:

- 1) подбор флуоресцентного и лигандного модулей, а также линкера, соединяющего их;
- 2) анализ модели пространственной структуры комплекса токсина с K<sup>+</sup> 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.

### 1.5.1 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.

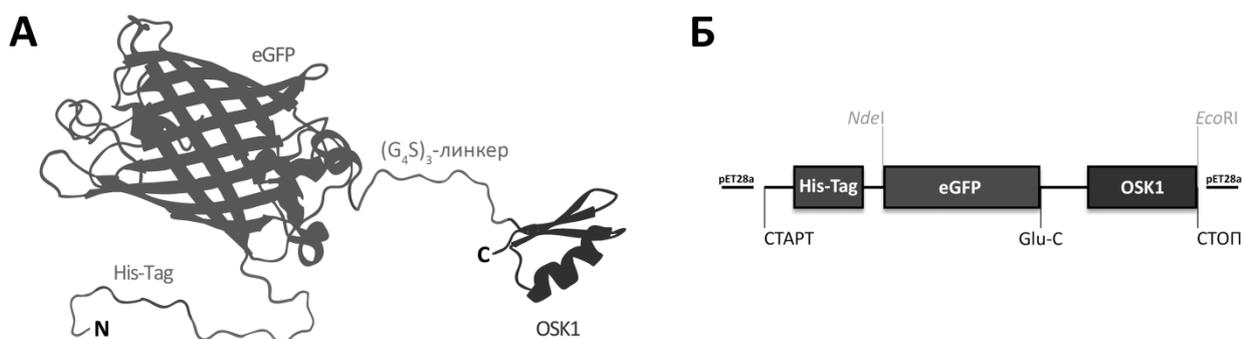


**Рисунок 6.** Молекулярная модель комплекса eGFP-OSK1 с  $K_v$  каналом. Модуль eGFP обозначен зеленым, OSK1 – синим, гибкий *N*-концевой участок химеры и  $(G_4S)_3$ -линкер – серым. Функционально важный остаток лизина модуля OSK1 обозначен красным. Модель была построена на основе известных пространственных структур eGFP (PDB ID: 2Y0G), OSK1 (PDB ID: 1SCO) и кристаллической структуры комплекса  $K_v1.2$ - $K_v2.1$  с ChTx (PDB ID: 4JTA).

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 7 А**).

OSK1 формирует в пространстве укладку типа  $CS\alpha/\beta$ , характерную для большинства блокаторов  $K^+$  каналов из яда скорпионов в том числе для ChTx. С помощью трехмерного выравнивания (программа PyMOL) пространственных структур ChTx в составе комплекса с химерой  $K_v1.2$  и  $K_v2.1$  и OSK1 было показано, что *N*-конец пептида лучше подходит для присоединения к нему линкера с eGFP.



**Рисунок 7.** А – схема организации химеры eGFP-OSK1. Обозначены функциональные элементы. Б – структура гена химерной молекулы eGFP-OSK1. Обозначены участки, кодирующие гексагистидиновую метку (His-Tag), флуоресцентный белок (eGFP) и токсин (OSK1). Также обозначены стартовый и стоп-кодоны, рестрикционные сайты и последовательность, кодирующая сайт гидролиза эндопротеиназой Glu-C.

### 1.5.2 Получение рекомбинантного eGFP-OSK1

Целевой ген химерного белка был фланкирован сайтами рестрикции *NdeI* и *EcoRI*, а также перед сайтом *EcoRI* был добавлен терминальный кодон. Ген eGFP-OSK1 (**Рисунок 7 Б**), кодирующий химеру флуоресцентного белка с токсином, получали методом ПЦР с использованием перекрывающихся праймеров. Для проведения экспрессии в бактериальной системе полученный ПЦР-продукт был встроен по сайтам *NdeI* и *EcoRI* 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*1 и *Eco*R1, 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 плаزمиды. 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.

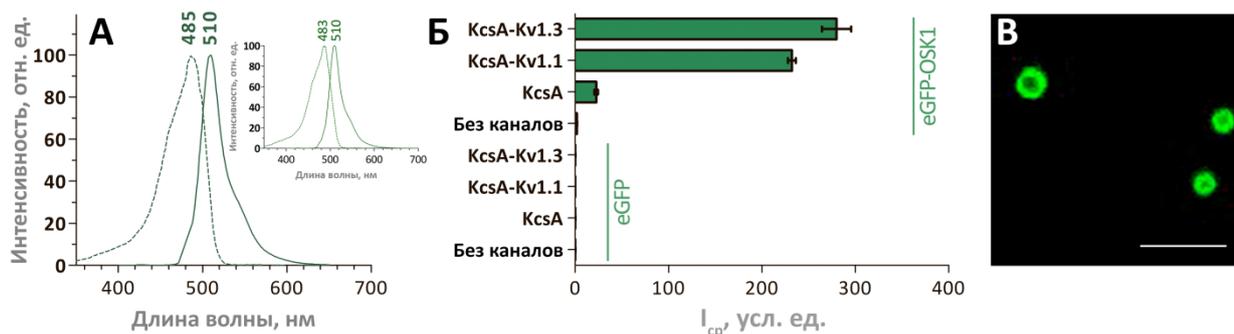
После подтверждения отсутствия ошибок в нуклеотидной последовательности гена eGFP-OSK1 несущий вектор был использован для трансформации клеток *E. coli* BL21(DE3). Проведена качественная оценка возможности экспрессии гена целевого белка: индукция экспрессии ИПТГ с последующей визуализацией результатов с помощью ДСН-ПААГ электрофореза. Правильность сворачивания модулей химерного белка анализировали по наличию поглощению в УФ, а также по способности связываться с  $K^+$  каналами.

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, а концентрация определялась по спектру поглощения в УФ-области. Выход целевого продукта составил ~20 мг с 1 л культуры.

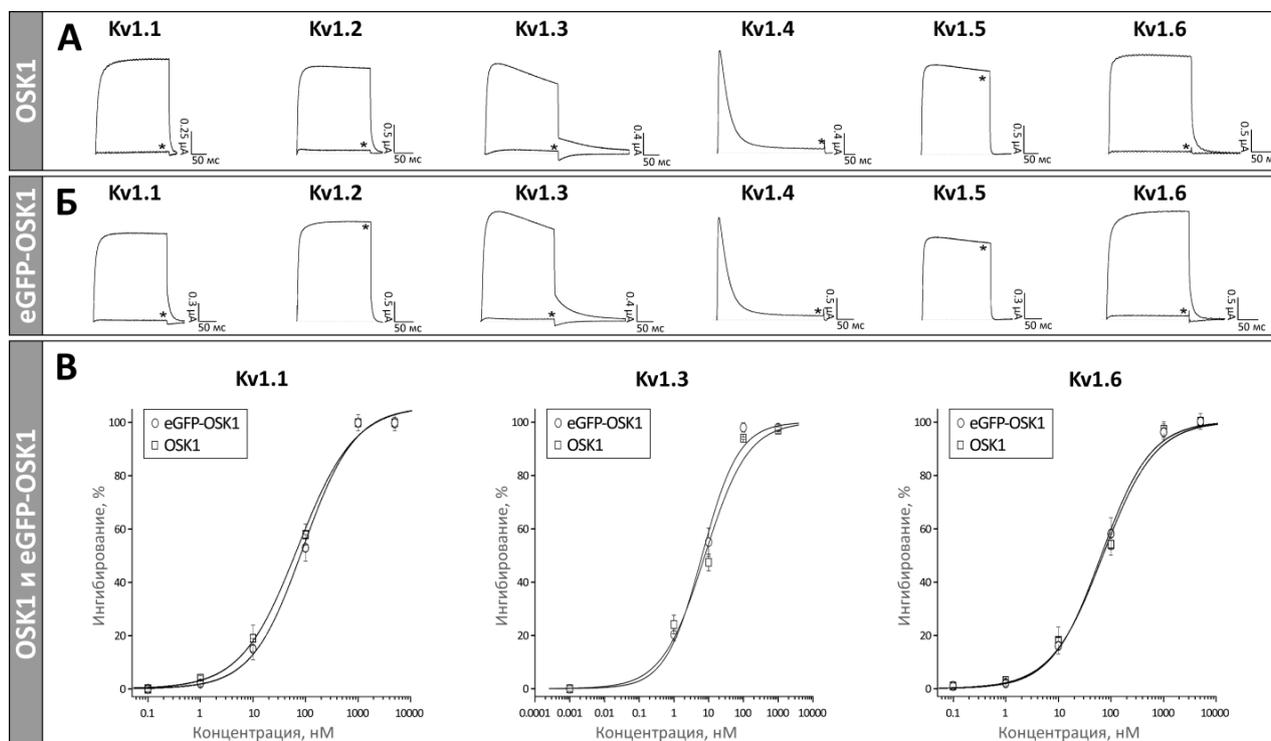
### **1.5.3 Физиологическая характеристика eGFP-OSK1**

Для eGFP-OSK1 были измерены спектры поглощения и испускания, которые оказались идентичными спектрам нативного eGFP без лигандного модуля (**Рисунок 8 А**). Было показано, что химерный белок способен взаимодействовать с гибридными каналами KcsA-K<sub>v</sub>1.1 и KcsA-K<sub>v</sub>1.3, экспрессированными в *E. coli*. Связывания нативного eGFP с этими же клетками, а также связывание eGFP-OSK1 с клетками, лишенными каналов, не наблюдалось (**Рисунок 8 Б, В**).



**Рисунок 8.** 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<sub>v</sub>1.3, KcsA-K<sub>v</sub>1.1 и KcsA, а также со сферопластами без рекомбинантных каналов. В – характерное конфокальное изображение сферопластов, несущих на поверхности KcsA-K<sub>v</sub>1.3, обработанных eGFP-OSK1. Масштаб – 4 мкм.

Для подтверждения физиологической активности eGFP-OSK1 на K<sub>v</sub> каналах был использован метод двухэлектродной фиксации потенциала. Химерная молекула была протестирована на K<sub>v</sub>1.1-K<sub>v</sub>1.6 каналах, а ее активность была сопоставлена с активностью нативного OSK1 на тех же мишенях (**Рисунок 9** А, Б). Полное отсутствие эффекта для OSK1 и eGFP-OSK1 наблюдалось на K<sub>v</sub>1.4 и K<sub>v</sub>1.5 каналах в максимальной концентрации 1 мкМ. Химерная молекула, в отличие от нативного токсина, потеряла способность блокировать K<sub>v</sub>1.2 даже в концентрации 10 мкМ.



**Рисунок 9.** Тестирование активности eGFP-OSK1 с помощью электрофизиологических измерений. Показаны кривые записей токов через K<sub>v</sub>1.1-1.6 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<sub>v</sub>1.1, K<sub>v</sub>1.3 и K<sub>v</sub>1.6.

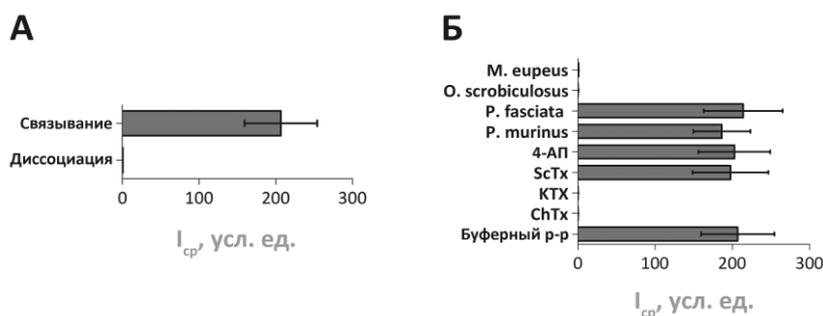
Для каналов, на которых наблюдался эффект нативного OSK1 и eGFP-OSK1 (K<sub>v</sub>1.1, K<sub>v</sub>1.3 и K<sub>v</sub>1.6), были построены кривые «доза-ответ» (Рисунок 9 В). Рассчитанные значения концентрации полуингибирования (IC<sub>50</sub>) для OSK1 и eGFP-OSK1, а также соответствующие коэффициенты Хилла представлены в Таблице 4.

**Таблица 4.** Сравнение значений IC<sub>50</sub> для OSK1 и eGFP-OSK1, а также соответствующие коэффициенты Хилла (h).

Лиганд	K <sub>v</sub> 1.1		K <sub>v</sub> 1.3		K <sub>v</sub> 1.6	
	IC <sub>50</sub> , нМ	h	IC <sub>50</sub> , нМ	h	IC <sub>50</sub> , нМ	h
OSK1	72±14	0,8±0,1	6±2	1,1±0,2	71±11	0,9±0,1
eGFP-OSK1	90±17	0,9±0,1	8±2	1,0±0,1	66±5	1,1±0,1

#### 1.5.4 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<sup>+</sup> каналов, а также цельный яд четырех паукообразных был протестирован на способность вытеснять eGFP-OSK1 из комплекса с KcsA-K<sub>v</sub>1.3 на поверхности сферопластов (Рисунок 10). Как и предполагалось, такие поровые блокаторы, как харибдотоксин (ChTx) и калиотоксин (КТХ), при избыточной концентрации вытесняли eGFP-OSK1 из комплексов с KcsA-K<sub>v</sub>1.3. Наоборот, сциллатоксин (ScTx) – блокатор SK<sub>Ca</sub>, а также 4-АП – низкомолекулярный лиганд, который связывается с другим сайтом K<sub>v</sub> каналов, – не показали никакого эффекта. Скрининг четырех ядов паукообразных продемонстрировал наличие поровых блокаторов K<sub>v</sub>1.3 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 10).



**Рисунок 10.** Применение eGFP-OSK1 с флуоресцентной системой на базе сферопластов для поиска поровых блокаторов K<sup>+</sup> каналов. А – обратимость связывания eGFP-OSK1 с KcsA-K<sub>v</sub>1.3 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<sup>+</sup> каналов (ChTx, КТХ, ScTx и 4-АП) на связывание eGFP-OSK1 с гибридными каналами на поверхности сферопластов.

### **1.5.5 Использование eGFP-OSK1 для визуализации hK<sub>v</sub>1.3, временно экспрессированных в клетках HEK293T**

Для визуализации K<sup>+</sup> каналов с помощью химерного белка eGFP-OSK1 были получены клетки HEK293T, временно экспрессирующие гомотетрамерные K<sub>v</sub>1.3 каналы человека (hK<sub>v</sub>1.3). Химерный белок (50 нМ) продемонстрировал способность связываться с hK<sub>v</sub>1.3 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 HEK293T, не экспрессирующими ген K<sub>v</sub>1.3. Положительным контролем выступили коммерчески доступные антитела к hK<sub>v</sub>1.3, показавшие идентичную картину окрашивания пермеабелизованных HEK293T. Кроме того, специфичность взаимодействия eGFP-OSK1 с hK<sub>v</sub>1.3 была подтверждена вытеснением флуоресцентной химеры из комплекса с каналом «холодным» лигандом OSK1. Фотографии полученных характерных флуоресцентных изображений представлены на **Рисунке 11 А**.

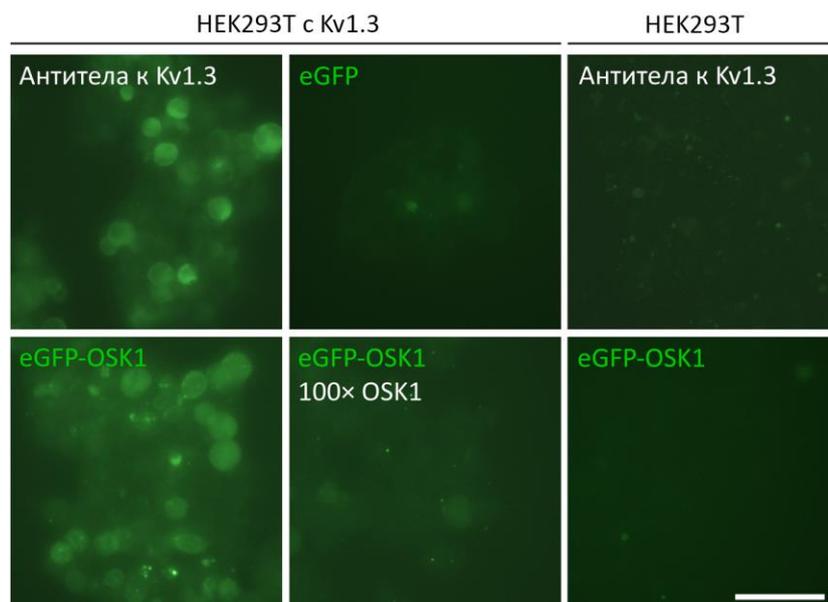
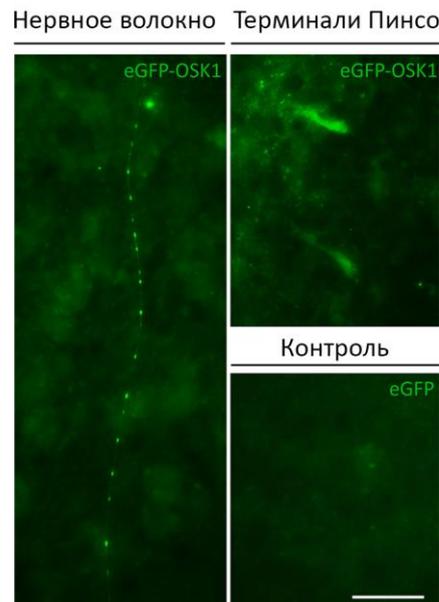
### **1.5.6 Применение eGFP-OSK1 для локализации K<sup>+</sup> каналов на срезах мозжечка крысы**

Химерный белок eGFP-OSK1 был использован для локализации K<sub>v</sub> каналов на срезах мозжечка крысы. Для этого фронтальные вибраторные срезы мозжечка крысы толщиной 200 мкм были обработаны раствором eGFP-OSK1 (50 нМ) в натрий-фосфатном буфере.

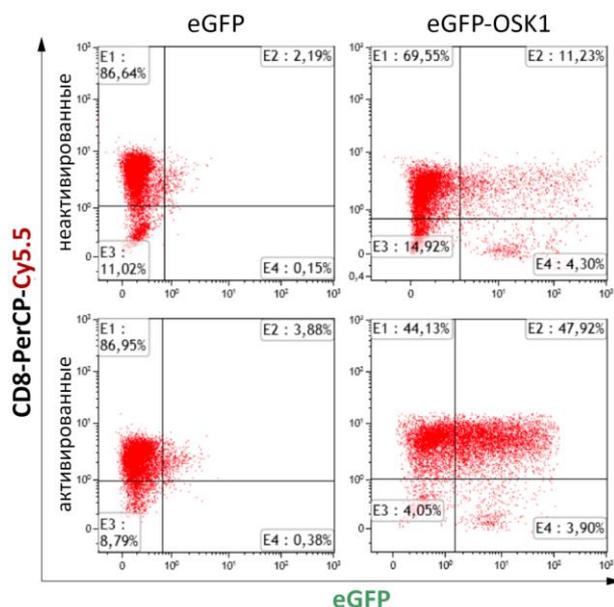
В качестве отрицательного контроля использовались срезы, обработанные тем же раствором, содержащим eGFP без модуля OSK1 (в максимальной концентрации 1 мкМ) вместо eGFP-OSK1. С помощью eGFP-OSK1 удалось визуализировать окончания Пинсо (синаптические структуры, образованные сплетением аксонов корзинчатых клеток вокруг аксона клеток Пуркинье, где наблюдается высокая экспрессия K<sub>v</sub>), располагающиеся на границе гранулярного и молекулярного слоев коры мозжечка. Кроме того, на большинстве образцов наблюдалась визуализация K<sub>v</sub> на поверхности нервных волокон, и в некоторых случаях она имела выраженную кластеризацию (**Рисунок 11 Б**). Результаты данного исследования сопоставимы с опубликованными работами, где для визуализации K<sub>v</sub> использовались специфические антитела.

### **1.5.7 Визуализация K<sup>+</sup> каналов с помощью eGFP-OSK1 на поверхности Т-лимфоцитов мыши**

Известно, что после активации Т-лимфоцитов у некоторых субпопуляций, характеризующихся CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> профилями поверхностных антигенов, увеличивается экспрессия K<sub>v</sub>1.3 на поверхности. Подобные фенотипические проявления возможны,

**А****Б**

**Рисунок 11.** А – 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. Б – Локализация  $K_v$  каналов с помощью eGFP-OSK1 на вибраторных 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.



**Рисунок 12.** Использование eGFP-OSK1 для визуализации  $K^+$  каналов на поверхности Т-лимфоцитов с помощью проточной цитометрии.

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 12**).

например, при развитии некоторых аутоиммунных заболеваний, таких как рассеянный склероз, ревматоидный артрит и диабет I типа.

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  $CD8^+$

## 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.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

### Статьи

1. **Kuzmenkov A.I.**, Nekrasova O.V., Kudryashova K.S., Peigneur S., Tytgat J., Stepanov A.V., Kirpichnikov M.P., Grishin E.V., Feofanov A.V., Vassilevski A.A. (2016) Fluorescent protein-scorpion toxin chimera is a convenient molecular tool for studies of potassium channels. *Sci Rep.* **6**:33314.
2. **Kuzmenkov A.I.**, Krylov N.A., Chugunov A.O., Grishin E.V., Vassilevski A.A. (2016) Kalium: a database of potassium channel toxins from scorpion venom. *Database (Oxford)*. **2016**, pii: baw056
3. **Kuzmenkov A.I.**, Grishin E.V., Vassilevski A.A. (2015) Diversity of Potassium Channel Ligands: Focus on Scorpion Toxins. *Biochemistry (Mosc)*. **80**, 1764–1799
4. **Kuzmenkov A.I.**, Vassilevski A.A., Kudryashova K.S., Nekrasova O.V., Peigneur S., Tytgat J., Feofanov A.V., Kirpichnikov M.P., Grishin E.V. (2015) Variability of Potassium Channel Blockers in *Mesobuthus eupeus* Scorpion Venom with Focus on  $Kv1.1$ : AN INTEGRATED TRANSCRIPTOMIC AND PROTEOMIC STUDY. *J. Biol. Chem.* **290**, 12195–209
5. Kudryashova K.S., Nekrasova O.V., **Kuzmenkov A.I.**, Vassilevski A.A., Ignatova A.A., Korolkova Y.V., Grishin, E. V., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V. (2013) Fluorescent system based on bacterial expression of hybrid KcsA channels designed for  $Kv1.3$  ligand screening and study. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 2379–89

### Тезисы докладов

1. **Kuzmenkov A.I.**, Shelukhina I.V., Kudryashova K.S., Nekrasova O.V., Bondarenko N.S., Peigneur S., Tytgat J., Feofanov A.V., Grishin E.V., Vassilevski A.A. Scorpion toxin conjugated with fluorescent protein is a novel tool for ion channel investigation. *Abstracts of the XII Congress*

of Pan-American Section of the International Society on Toxinology, Miami-Beach, FL, USA, 18–23 September 2016, #93632554.

2. Василевский А.А., Опарин П.Б., Сачкова М.Ю., **Кузьменков А.И.**, Беркут А.А., Гришин Е.В. Новые инструменты для нейробиологии на основе токсинов паукообразных. *Тезисы докладов VII Российский симпозиум «Белки и пептиды»*, Новосибирск, Россия, 12–17 июля 2015, стр. 157

3. **Kuzmenkov A.**, Kudryashova K., Nekrasova O., Feofanov A., Kirpichnikov M., Grishin E., Vassilevski A. Scorpion toxin fused with fluorescent protein is a novel probe to study potassium channels. *Abstracts of 40th FEBS Congress*, Berlin, Germany, July 4–9 2015, pg. 166

4. Kudryashova K.S., **Kuzmenkov A.I.**, Nekrasova O.V., Feofanov A.V., Grishin E.V., Vassilevski A.A. Novel Kv1.3 blockers for the treatment of autoimmune diseases. *Abstracts of 39th FEBS/EMBO Congress*, Paris, France, 30 August–4 September 2014, pg. 149

5. **Kuzmenkov A.I.**, Vassilevski A.A., Kudryashova K.S., Nekrasova O.V., Feofanov A.V., Kirpichnikov M.P., Grishin E.V. Variability of potassium channel blockers in *Mesobuthus eupeus* scorpion. *Abstracts of 39th FEBS/EMBO Congress*, Paris, France, 30 August–4 September 2014, pg. 387

6. **Кузьменков А.И.**, Василевский А.А., Кудряшова К.С., Некрасова О.В., Феофанов А.В., Кирпичников М.П., Гришин Е.В. Разнообразие блокаторов калиевых каналов в яде скорпиона *Mesobuthus eupeus*. *Тезисы докладов и стендовых сообщений XXVI зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии»*, Москва, Россия, 10–14 февраля 2014, стр. 93

7. Kudryashova K.S., Nekrasova O.V., **Kuzmenkov A.I.**, Vassilevski A.A., Feofanov A.V., A novel fluorescence system for potassium channel Kv1.1 and Kv1.3 ligand screening. *9th European-Biophysical-Societies-Association*, Lisbon, Portugal, July 13–17 2013, pg. S81

8. **Кузьменков А.И.**, Кудряшова К.С., Василевский А.А., Королькова Ю.В., Некрасова О.В., Феофанов А.В., Кирпичников М.П., Гришин Е.В. Поиск и идентификация лигандов калиевых каналов Kv1.1 и Kv1.3 в яде паукообразных. *Тезисы докладов VI Российского симпозиума «Белки и пептиды»*, Уфа, Россия, 10–15 июня 2013, стр. 210

9. **Кузьменков А.И.**, Кудряшова К.С., Василевский А.А., Королькова Ю.В., Некрасова О.В., Феофанов А.В., Гришин Е.В. Идентификация лигандов калиевого канала Kv1.3 в яде черного скорпиона *Orthochirus scrobiculosus*. *Биология – наука XXI века: 16-я Международная Пуцинская школа-конференция молодых ученых*, Пушино, Россия, 16–21 апреля 2012, стр. 181

10. **Кузьменков А.И.**, Кудряшова К.С., Василевский А.А., Королькова Ю.В., Некрасова О.В., Феофанов А.В., Кирпичников М.П., Гришин Е.В. Природные яды – источник эффективных блокаторов калиевого канала человека Kv1.3. *Тезисы докладов III международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине»*, Казань, Россия, 22–24 ноября 2012, стр. 419

11. **Кузьменков А.И.**, Кудряшова К.С., Василевский А.А., Королькова Ю.В., Некрасова О.В., Феофанов А.В., Кирпичников М.П., Гришин Е.В. Система поиска лигандов калиевого канала человека Kv1.3. *Тезисы конференции «Молекулярная медицина и постгеномная биология»*, Москва, Россия, 23–24 мая 2012, стр. 74

## Благодарности

- 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 цитогистохимических 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.