



УДК 595.461:577.112.6:615.919

## ПРОИЗВОДНОЕ НЕЙРОТОКСИНА СКОРПИОНА ВеМ9, СЕЛЕКТИВНОЕ В ОТНОШЕНИИ ПОТЕНЦИАЛ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ НАСЕКОМЫХ

© 2021 г. М. А. Черных\*, Н. А. Кульдюшев\*, С. Пеньёр\*\*, А. А. Беркут\*, Я. Титгат\*\*, Р. Г. Ефремов\*, \*\*\*, А. А. Василевский\*, \*\*\*, #, А. О. Чугунов\*, \*\*\*

\*ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН, Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

\*\*KU Leuven, ON II, Belgium, 3000 Leuven, Herestraat 49, box 922

\*\*\*Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Россия, 141701 Долгопрудный, Институтский пер., 9, стр. 3

Поступила в редакцию 01.10.2020 г.

После доработки 23.10.2020 г.

Принята к публикации 25.10.2020 г.

$\alpha$ -Нейротоксины скорпионов – небольшие белки, способные ингибировать инактивацию потенциал-чувствительных натриевых каналов. Они могут селективно действовать на каналы млекопитающих (млекотоксины), каналы насекомых (инсектотоксины) либо на оба типа каналов ( $\alpha$ -подобные токсины). Модель, полноценно объясняющая селективность исходя из аминокислотной последовательности, еще не предложена, однако уже установлены некоторые закономерности. Так, у большей части млекотоксинов имеется остаток D8, участвующий в формировании так называемого мотива гнезда, но до сих пор не ясно, участвует ли этот остаток во взаимодействии с каналами. Задачей нашего исследования было получить производное  $\alpha$ -подобного токсина ВеМ9 с заменой лизина в 8-м положении на глутамат (K8E), изменив заряд, но при этом исключив образование мотива гнезда. Кроме того, мы заменили тирозин в 17-м положении на характерный для млекотоксинов глицин (Y17G). Неожиданно оказалось, что производное с двумя заменами ВеМ9<sup>EG</sup> утратило активность на каналах млекопитающих, став инсектотоксином. Чтобы объяснить эти изменения, мы построили пространственные модели комплексов ВеМ9 и ВеМ9<sup>EG</sup> с каналами, а также провели расчеты молекулярной динамики изолированных токсинов. Анализ межмолекулярных контактов в комплексах не позволил объяснить причину изменения селективности. Тем не менее структура внутримолекулярных контактов и данные по молекулярной подвижности указывают на важную роль остатков K8 и Y17 в стабилизации определенной конформации петель ВеМ9. Мы предполагаем, что замена этих остатков аллостерически влияет на эффективность связывания токсинов с каналами.

*Ключевые слова:* нейротоксины, потенциал-чувствительные натриевые каналы, белковая инженерия, молекулярная динамика

DOI: 10.31857/S0132342321040060

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время продолжается разработка соединений, способных избирательно воздействовать на мишени в нервной системе насекомых, такие как потенциал-чувствительные натриевые каналы (ПЧНК). ПЧНК – трансмембранные белки, состоящие из четырех гомологичных повторов (D I–IV). Первые четыре спирали (S1–S4) каждо-

го повтора и петли между ними составляют потенциал-чувствительный домен (ПЧД), реагирующий на изменение трансмембранного потенциала; еще две спирали (S5 и S6) входят в состав единого порового домена (ПД), пропускающего ионы. Активация ПЧД I–III необходима для открытия ПД, в то время как активация ПЧД IV приводит к быстрой инактивации каналов [1, 2].

Среди природных нейротоксинов находят модуляторы и блокаторы ионных каналов, зачастую имеющие белковую природу и селективно действующие на определенный вид каналов у определенных организмов. В частности, в яде скорпионов найдены так называемые  $\alpha$ -токси-

Сокращения: ПД – поровый домен; ПЧД – потенциал-чувствительный домен; ПЧНК – потенциал-чувствительные натриевые каналы; ВеМ9<sup>EG</sup> – производное  $\alpha$ -подобного токсина скорпиона;  $\alpha$ -NaTx –  $\alpha$ -нейротоксины скорпионов.

# Автор для связи: (эл. почта: avas@ibch.ru).

ны ( $\alpha$ -NaTx), ингибирующие инактивацию ПЧНК за счет связывания с ПЧД IV (петли S1–S2 и S3–S4) и ПД I (петля S5–S6) каналов [3]. Некоторые  $\alpha$ -NaTx могут избирательно воздействовать на каналы млекопитающих (их называют млекотоксинами), другие – на каналы насекомых (инсектотоксины), а третьи ( $\alpha$ -подобные) характеризуются широким спектром активности [4, 5]. Изучение природы селективности  $\alpha$ -NaTx может помочь не только в фундаментальных исследованиях: специфичные инсектотоксины, по-видимому, могут использоваться в качестве инсектицидов, безопасных для позвоночных [6].

В 2013 г. после сравнительного анализа свойств молекулярной поверхности разных групп  $\alpha$ -NaTx была выдвинута гипотеза, что их селективность определяется прежде всего модулем специфичности – частью токсина, образованной *N*-концевой областью (называемой также RT-петлей), петлей в шпильке  $\beta_2$ – $\beta_3$  и *C*-концевой областью токсина, скрепленной с *N*-концевой частью дисульфидной связью (рис. 1а) [7]. Исследованная недавно с помощью криоэлектронной микроскопии структура комплекса млекотоксина Aah2 из яда скорпиона *Androctonus australis* с хищным ПЧНК показала, что модуль специфичности действительно формирует контакты с каналом, тогда как остальная часть токсина (сердцевинный модуль) практически не взаимодействует с каналом [3].

$\alpha$ -Подобный токсин M9 (ВеМ9) из яда скорпиона *Mesobuthus eupeus* (ранее назывался *Buthus eupeus*) – один из наиболее изученных  $\alpha$ -NaTx; его пространственная структура была исследована в Институте биоорганической химии еще в 1980-х гг., став первой изученной структурой  $\alpha$ -NaTx [8, 9]. Ранее мы использовали этот  $\alpha$ -NaTx для получения на его основе специфичного млекотоксина: на каркас ВеМ9 был перенесен модуль специфичности токсина Aah2; кроме того, потребовалась замена нескольких аминокислотных остатков сердцевинного модуля [10]. Внимательное изучение пространственного строения ВеМ9 выявило ключевое значение остатка R60 в *C*-концевой области токсина для организации модуля специфичности за счет формирования сети водородных связей с образованием особого варианта мотива “ниши” – так называемой “аргининовой руки” [11]. Мутант R60K теряет возможность взаимодействовать с каналами млекопитающих, становясь инсектотоксином.

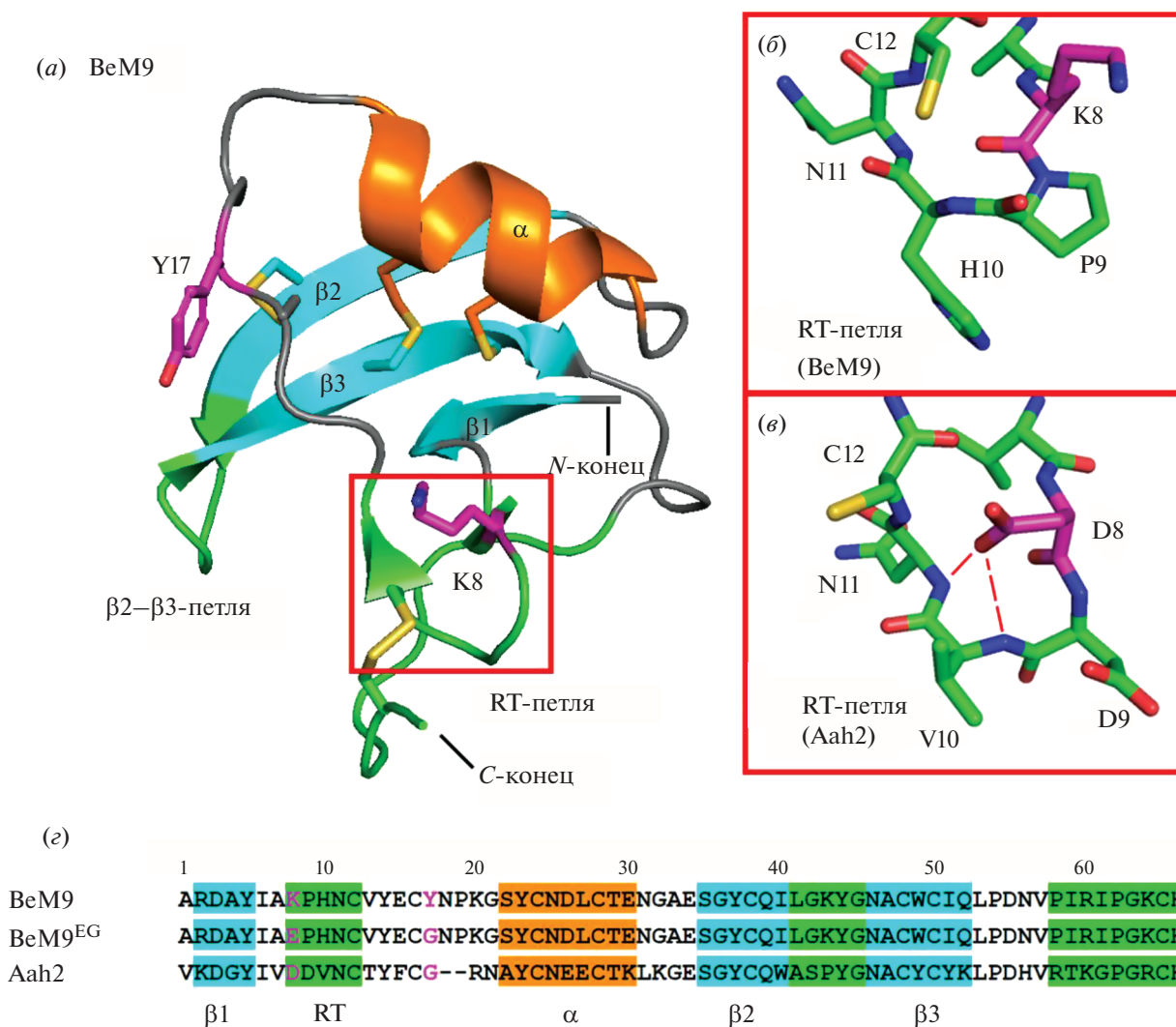
В данном исследовании мы сосредоточились на роли другой части модуля специфичности (RT-петле; рис. 1б) и получили новое производное ВеМ9, обладающее избирательностью в отношении ПЧНК насекомых.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Выбор аминокислотных замен для модификации ВеМ9.** Сравнение аминокислотных последовательностей  $\alpha$ -NaTx показало, что у млекотоксинов в RT-петле присутствует высококонсервативный остаток аспарагиновой кислоты в 8-м положении. У инсектотоксинов и  $\alpha$ -подобных токсинов в этом положении обычно имеется нейтральный (Q) или положительно заряженный остаток (K, как у ВеМ9). Интересно при этом, что у классического инсектотоксина *BjaIT* из яда *Hottentotta judaicus* здесь, как и у млекотоксинов, находится остаток аспарагиновой кислоты [12]. Внимательный анализ пространственной структуры различных  $\alpha$ -NaTx показал, что у млекотоксинов данный остаток участвует в поддержании определенной конформации RT-петли за счет формирования множества водородных связей с –NH-группами основной цепи (так называемый мотив гнезда [13], рис. 1в). Мы решили узнать, играет ли непосредственно отрицательный заряд остатка в 8-м положении важную роль во взаимодействии с каналами млекопитающих. Чтобы при этом предотвратить образование мотива гнезда, мы провели замену K8 у ВеМ9 на остаток не аспаргиновой, а глутаминовой кислоты, длина боковой цепи которой не оптимальна для этого мотива.

Как было обнаружено ранее [7], RT-петля у млекотоксинов характеризуется сравнительно высокой подвижностью. Отчасти это объясняется тем, что на участке, соединяющем RT-петлю с  $\alpha$ -спиралью, у млекотоксинов встречается характерный остаток глицина G17 (по нумерации Aah2). На основании анализа аминокислотных последовательностей и пространственной структуры  $\alpha$ -NaTx мы предположили, что изменение заряда и подвижности RT-петли за счет двух мутаций (K8E и Y17G, рис. 1з) придаст  $\alpha$ -подобному токсину ВеМ9 специфичность к каналам млекопитающих. Для проверки этого предположения мы приступили к получению производных ВеМ9 с указанными заменами.

**Получение рекомбинантного ВеМ9 и его производных.** Для получения достаточного материала для исследования активности мы использовали бактериальную экспрессионную систему и плазмиду, кодирующую ВеМ9, полученную в предыдущем исследовании [7, 11]. ДНК, кодирующая ВеМ9-K8E (ВеМ9<sup>E</sup>) и ВеМ9-K8E,Y17G (ВеМ9<sup>EG</sup>), была получена с помощью ПЦР с перекрывающимися синтетическими олигонуклеотидами. Гены целевых полипептидов клонировали в одной рамке считывания с геном белка-носителя тиоредоксина (Trx). Слитные белки Trx-ВеМ9, Trx-ВеМ9<sup>E</sup> и Trx-ВеМ9<sup>EG</sup> выделяли из общего лизата бактериальных клеток с помощью металл-хелатной хроматографии. Целевые полипептиды отделяли от Trx с



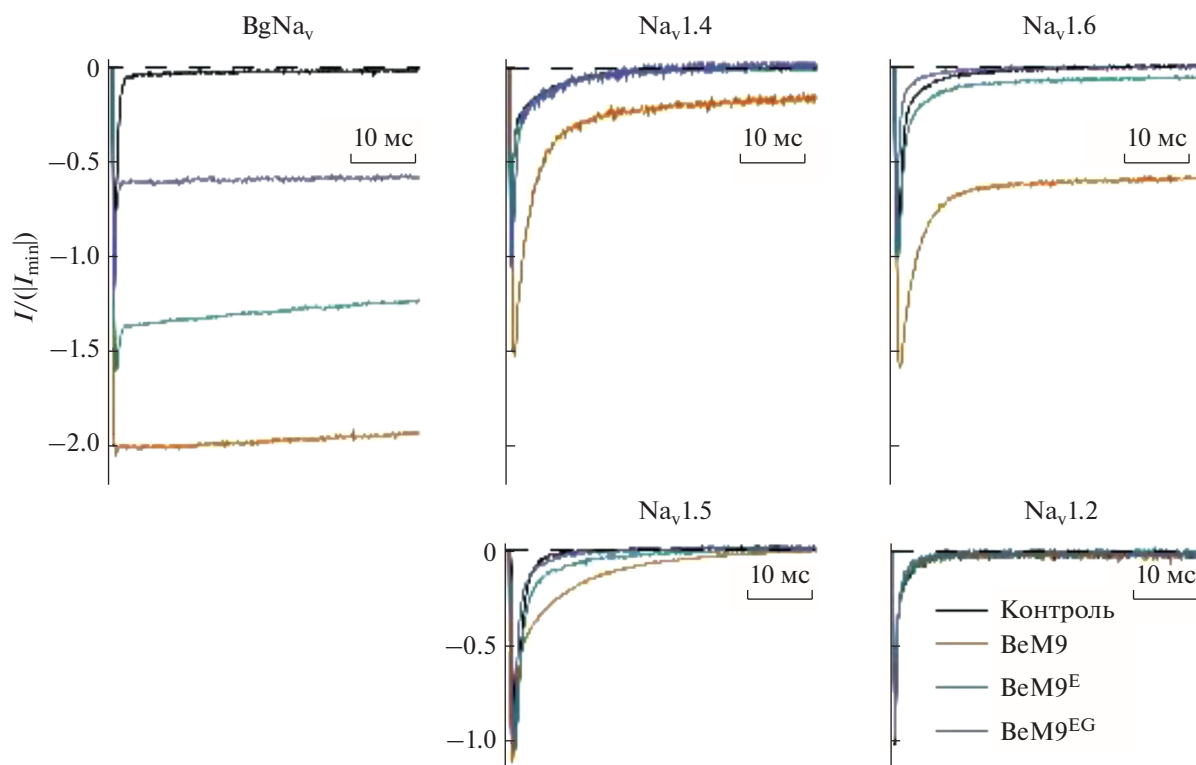
**Рис. 1.** Структура  $\alpha$ -NaTx. (а) – Общий план строения на примере  $\alpha$ -подобного токсина ВеМ9 (PDB ID: 5MOU [11]). Зеленым цветом выделен модуль специфичности согласно гипотезе [7], состоящий из RT-петли,  $\beta_2$ – $\beta_3$ -петли и C-концевого участка, тогда как остальная часть называется сердцевинным модулем; голубым цветом показан  $\beta$ -лист из трех  $\beta$ -тяжей ( $\beta_1$ – $\beta_3$ ), оранжевым –  $\alpha$ -спираль, желтым – связи атомов серы, участвующих в построении дисульфидных мостиков, фиолетовым – аминокислотные остатки, подтвержденные заменам; (б, в) – строение RT-петли у ВеМ9 и типичного млекопитающего Ааh2 (PDB ID: 1PTX [14]). У Ааh2 наблюдается мотив гнезда: боковая цепь остатка D8 ориентирована внутрь RT-петли и образует водородные связи (показаны красным пунктиром) с –NH-группами основной цепи остатков V10 и N11, тогда как у ВеМ9 K8 ориентирован наружу и систему связей не образует; (г) – сравнение аминокислотных последовательностей ВеМ9, его двойного мутанта ВеМ9<sup>EG</sup> и Ааh2. Цветовые обозначения аналогичны панели (а).

использованием бромциана. Хроматографическая чистота полипептидов более 95% была достигнута с помощью двух раундов ВЭЖХ.

Корректный синтез целевых полипептидов с образованием дисульфидных связей был подтвержден путем измерения молекулярной массы очищенных продуктов методом MALDI-масс-спектрометрии: измеренные массы ВеМ9, ВеМ9<sup>E</sup> и ВеМ9<sup>EG</sup> составляли 7335.1, 7336.1 и 7230.1 Да соответственно (расчетные массы 7335.2, 7336.2 и 7230.0 Да); выход – 2 мг с 1 л среды LB. Существенная проблема при гетерологической экс-

прессии белков – правильное формирование дисульфидных связей. В случае ВеМ9 и его производных эта проблема решается за счет Trx: известно, что он способствует корректному фолдингу дисульфид-содержащих белков [15]. Недавно решенная с помощью спектроскопии ЯМР пространственная структура рекомбинантного ВеМ9 подтверждает корректность образования S–S-мостиков [11].

**Изучение активности производных ВеМ9 на ПЧНК.** Эффекты производных ВеМ9 были изучены в сравнении с исходным токсином в кон-



**Рис. 2.** Активность токсина ВеМ9 и его производных на изоформах потенциал-чувствительных натриевых каналов. Показаны токи через мембрану ооцитов, экспрессирующих клонированные изоформы ПЧНК, в контроле и после инкубации с токсинами в концентрации 1 мкМ. Пунктирная линия показывает нулевой уровень тока. Амплитуда тока приведена в условных единицах  $I/(I_{\min})$  (см. пояснения в “Эксперим. части”). Представлены репрезентативные записи по крайней мере трех независимых экспериментов.

центрации 1 мкМ в отношении ряда ПЧНК. Был применен стандартный подход, подразумевающий экспрессию генов каналов ( $\alpha$ -субъединиц и соответствующих вспомогательных  $\beta$ -субъединиц) в ооцитах *Xenopus laevis* (рис. 2). Как и исходный токсин, ВеМ9<sup>E</sup> и ВеМ9<sup>EG</sup> не проявляли активности в отношении Na<sub>v</sub>1.2, но были активны на канале таракана BgNa<sub>v</sub>1, хотя активность стала менее выраженной (табл. 1). В отличие от ВеМ9, у ВеМ9<sup>E</sup> была резко снижена активность на Na<sub>v</sub>1.5 и Na<sub>v</sub>1.6, тогда как ВеМ9<sup>EG</sup> не проявил активности на этих каналах вообще. Таким образом, ВеМ9<sup>EG</sup> не был активен на всех протестирован-

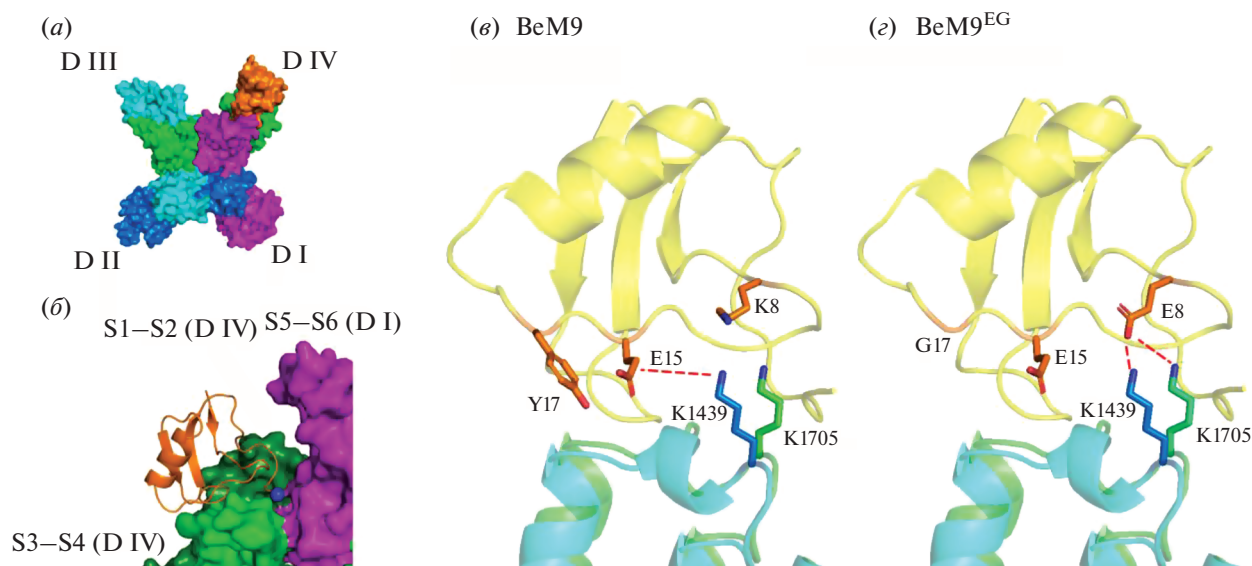
ных каналах млекопитающих и был классифицирован как инсектотоксин.

В 2019 г. была определена пространственная структура комплекса химерного канала hNa<sub>v</sub>1.7-Na<sub>v</sub>Pas (фрагменты аминокислотной последовательности канала таракана *Periplaneta americana* Na<sub>v</sub>Pas, включая внеклеточные петли ПЧД IV и контактирующий участок ПД I, были заменены на соответствующие участки канала человека Na<sub>v</sub>1.7) с млекотоксином Aah2 (PDB ID: 6NT4 [3]). Мы предположили, что модели комплексов ВеМ9 с ПЧНК млекопитающих и насекомых, построенные на ее основе, могут объяснить природу селективности ВеМ9<sup>EG</sup>. Для этого

**Таблица 1.** Активность токсина ВеМ9 и его производных в отношении потенциал-чувствительных натриевых каналов

| Токсин             | Na <sub>v</sub> 1.2 | Na <sub>v</sub> 1.4 | Na <sub>v</sub> 1.5 | Na <sub>v</sub> 1.6 | BgNa <sub>v</sub> 1 |
|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| ВеМ9               | Н/а (3)             | 0.23 ± 0.03 (4)     | 0.46 ± 0.03 (3)     | 0.60 ± 0.04 (8)     | 1.93 ± 0.05 (7)     |
| ВеМ9 <sup>E</sup>  | Н/а (3)             | Н/а (4)             | 0.05 ± 0.01 (4)     | 0.05 ± 0.04 (3)     | 1.16 ± 0.03 (5)     |
| ВеМ9 <sup>EG</sup> | Н/а (3)             | Н/а (4)             | Н/а (4)             | Н/а (4)             | 0.56 ± 0.06 (6)     |

Примечание: Н/а – нет активности. Указаны значения  $I_{30\text{ мс}}/I_{\min}$  или  $I_{5\text{ мс}}/I_{\min}$  (для Na<sub>v</sub>1.5), пояснения в “Эксперим. части”. Приведены средние значения ± стандартное отклонение, в скобках указано число независимых экспериментов (*n*).



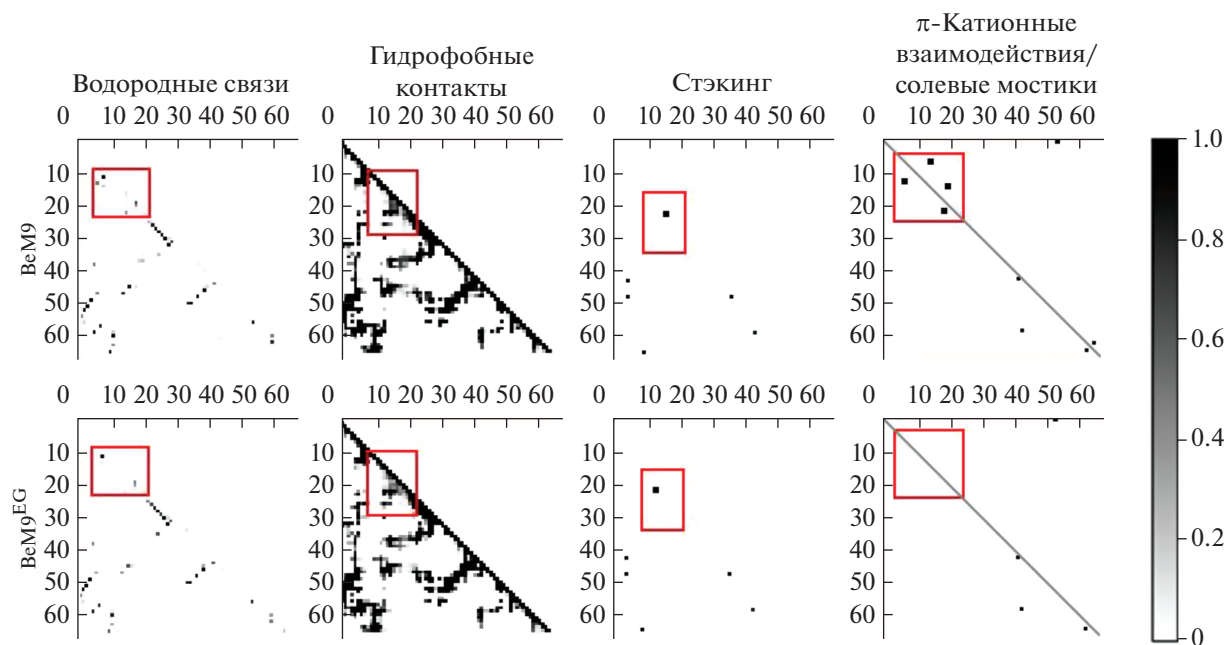
**Рис. 3.** Модели комплексов потенциал-чувствительных натриевых каналов с  $\alpha$ -токсином ВеМ9 и его мутантом ВеМ9<sup>EG</sup>. (а) – Общий вид комплекса ПЧНК с  $\alpha$ -NaTx с внеклеточной стороны. ПЧНК изображен цветной поверхностью с индивидуально раскрашенными гомологичными повторами: D I (фиолетовый), D II (синий), D III (голубой), D IV (зеленый). Расположенные в центре части каждого повтора формируют ПД, дистальные части образуют ПЧД I–IV. Токсин (показан оранжевым) связывается с каналом в области ПЧД IV, частично захватывая ПД I; (б) – сайт связывания токсина (увеличен). Петля S3–S4 обозначена светло-зеленым, S1–S2 – темно-зеленым, ПД I – фиолетовым, С-конец токсина отмечен синей сферой; (в, г) – ионные связи RT-петли ВеМ9 с S3–S4-петлей ПЧНК. Желтым показана молекула токсина (ВеМ9 на панели (в) и ВеМ9<sup>EG</sup> на панели (г)), голубым –  $\text{Na}_v1.4$ , зеленым –  $\text{BgNa}_v$ . Оранжевым выделены ключевые аминокислотные остатки токсина, участвующие во взаимодействии с каналами или подверженные мутагенезу.

были построены статичные модели ВеМ9 и ВеМ9<sup>EG</sup> с каналами  $\text{Na}_v1.4$  человека и  $\text{BgNa}_v$  таракана и изучены межмолекулярные контакты в них (подробности моделирования см. в “Эксперим. части”). Мы ожидали увидеть явное изменение межмолекулярных контактов, способствующее потере аффинности ВеМ9<sup>EG</sup> к каналам млекопитающих, однако результаты простейшего моделирования этого не показали. Согласно полученной модели, остатки Y17/G17 не формируют контакты с каналом и не могут напрямую влиять на активность токсина. K8 в ВеМ9 не участвует во взаимодействии с каналами, в то время как в ВеМ9<sup>EG</sup> E8 образует межмолекулярную ионную связь с остатком K1439/1705 (номер остатка у  $\text{hNa}_v1.4/\text{BgNa}_v$ ) (рис. 3в, 3г). Однако в случае ВеМ9 с K1439/1705 аналогичный контакт тоже имеет место, но его образует другой остаток – E15.

Анализ комплексов не позволяет сказать, почему изменяется селективность ВеМ9<sup>EG</sup>, поскольку структура петли S3–S4 крайне консервативна. Мы предположили, что причина этого явления кроется прежде всего в аллостерических эффектах, что привело нас к анализу изменения структуры и внутримолекулярных контактов у токсина после внесения мутаций.

**Анализ изменений структуры ВеМ9, вызванных мутациями.** Поскольку мы не смогли объяснить изменения специфичности, моделируя статичные комплексы ВеМ9/ПЧНК, было решено изучить динамические свойства молекулы токсина ВеМ9 и его производного ВеМ9<sup>EG</sup>. Для этого мы рассчитали для каждого из них молекулярную динамику длительностью 100 нс в трех повторностях, а затем провели поиск структурных изменений с помощью анализа внутримолекулярных контактов нескольких типов: водородных связей, гидрофобных взаимодействий, солевых мостиков, стэкинга и  $\pi$ -катионных взаимодействий, представляя их в виде карты контактов – массива точек  $66 \times 66$  (рис. 4).

Анализ внутримолекулярных контактов, а также вычисление значений среднеквадратичных флуктуаций (Root Mean Square Fluctuation, RMSF) показали, что одна из мутаций (Y17G) повышает подвижность петли перед  $\alpha$ -спиралью за счет потери гидрофобных взаимодействий и стэкинга Y17–Y23, а также увеличения гибкости основной цепи за счет введения остатка глицина. Новообразовавшийся в ВеМ9<sup>EG</sup> контакт Y14–Y23, по-видимому, не оказывает стабилизирующего действия на данный участок токсина. Ключевые эффекты мутации Y17G показаны на рис. 5.



**Рис. 4.** Карты внутримолекулярных контактов токсина ВеМ9 и его мутанта ВеМ9<sup>EG</sup>. Координаты каждой точки соответствуют номерам остатков, которые могут образовывать контакт. Интенсивность окраски точек для водородных связей и гидрофобных контактов (см. шкалу справа) пропорциональна доле времени от суммарной длительности трех траекторий молекулярной динамики ( $3 \times 100$  нс), в течение которой этот контакт существует. Остальные типы контактов показаны качественно: если контакт существует более 10% времени, он выделен точкой, если менее – не показан. Контакты, находящиеся в окрестностях RT-петли, обведены красной рамкой и представлены более крупными точками. Красными рамками выделены области наиболее значимых отличий между ВеМ9 и ВеМ9<sup>EG</sup>, отражающие эффекты мутаций К8Е и Y17G. Для  $\pi$ -катионных взаимодействий и солевых мостиков приведена одна карта: сверху над диагональю изображены солевые мостики, снизу –  $\pi$ -катионные взаимодействия.

Влияние ключевой мутации К8Е раскрывается через изменение системы солевых мостиков и  $\pi$ -катионных взаимодействий (рис. 6). Мотив гнезда, как и предполагалось, у мутанта не наблюдается (рис. 6б). Кроме того, в ВеМ9 существует стабильная система взаимодействующих пар остатков К8–Y14 и К8–E15, смена заряда в 8-й позиции на противоположный разрушает ее за счет отталкивания одноименных зарядов E8–E15. Также у мутанта утрачивается контакт E15–K20, что может объясняться эффектом обеих замен. К8 может балансировать между Y14 и E15, а E15 – между К8 и К20, что может обеспечивать переход между двумя стабильными конформациями ВеМ9, тогда как в ВеМ9<sup>EG</sup> структура в целом более подвижна и менее упорядочена.

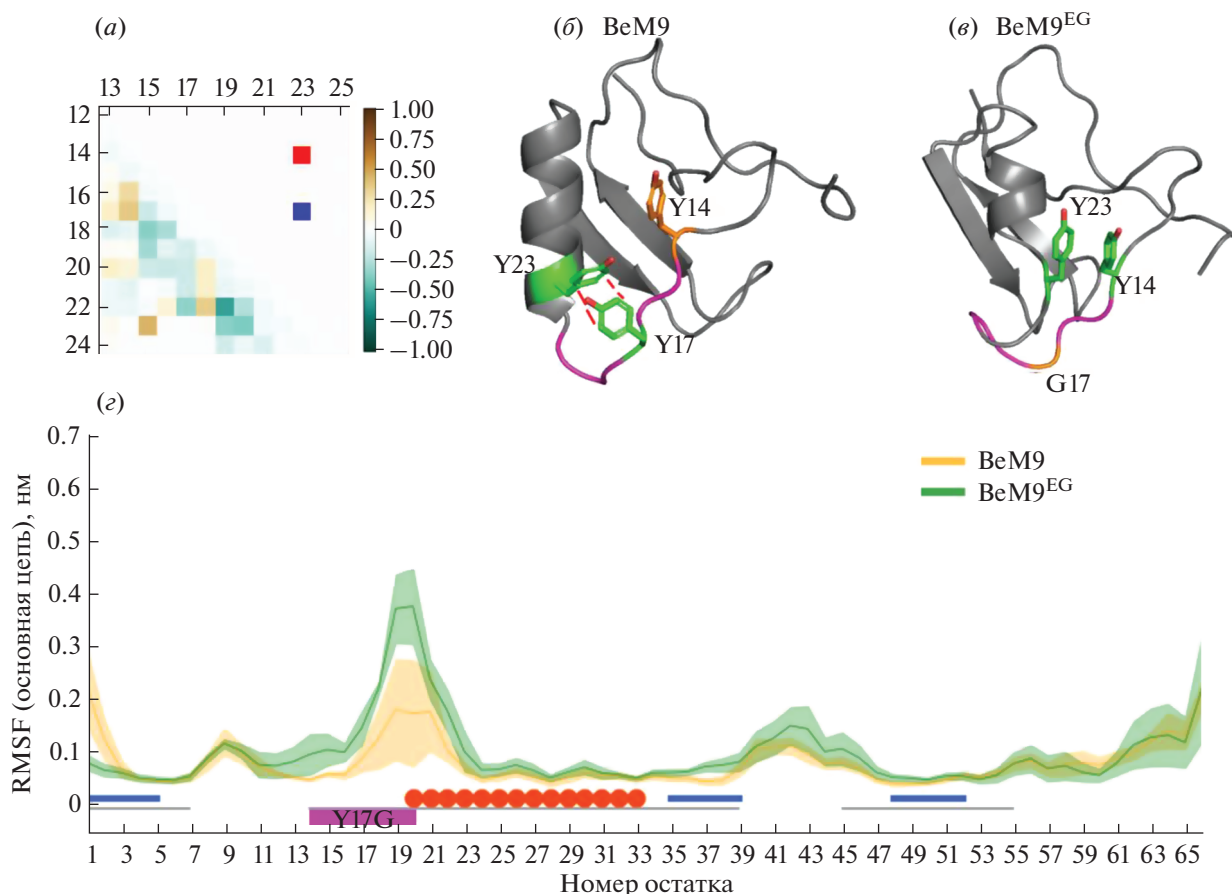
## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Получение рекомбинантных производных ВеМ9.** Синтез нуклеотидных последовательностей, кодирующих ВеМ9<sup>E</sup> и ВеМ9<sup>EG</sup>, был проведен с помощью лигирования олигонуклеотидных фрагментов (табл. 2) и ПЦР аналогично описанной ранее процедуре для ВеМ9 [7, 16]. Полученные полноразмерные последовательности были клонированы в экспрессионный вектор рЕТ-32b

(Novagen, США) по сайтам рестрикции KpnI и BamHI. В результате в составе вектора были получены химерные гены слитных белков, состоящих из Trx и токсина: Trx-ВеМ9<sup>E</sup> и Trx-ВеМ9<sup>EG</sup>.

Экспрессию химерных генов проводили в штамме *Escherichia coli* BL21(DE3) [17]. Культуру бактерий, трансформированных с использованием экспрессионного вектора, выращивали в среде LB с добавлением ампициллина (100 мкг/мл) при 37°C и интенсивном перемешивании. Индукцию экспрессии целевых генов осуществляли добавлением в среду 0.2 мМ изопрропил- $\beta$ -D-1-тиога-лактопиранозид, после чего культуру инкубировали еще 4 ч. По истечении этого времени бактерии осаждали, ресуспендировали в стартовом буфере для аффинной хроматографии (300 мМ NaCl, 20 мМ Трис-HCl, pH 7.5) и лизировали с помощью ультразвука.

Слитные белки имели в своем составе гексагистидиновую последовательность, которая позволяет проводить их очистку с помощью металл-хелатной хроматографии [18] на сорбенте TALON Superflow Metal Affinity Resin (Clontech, США). Элюцию сорбированных белков проводили буфером, содержащим имидазол (150 мМ имидазол, 300 мМ NaCl, 20 мМ Трис-HCl, pH 7.5). Последо-



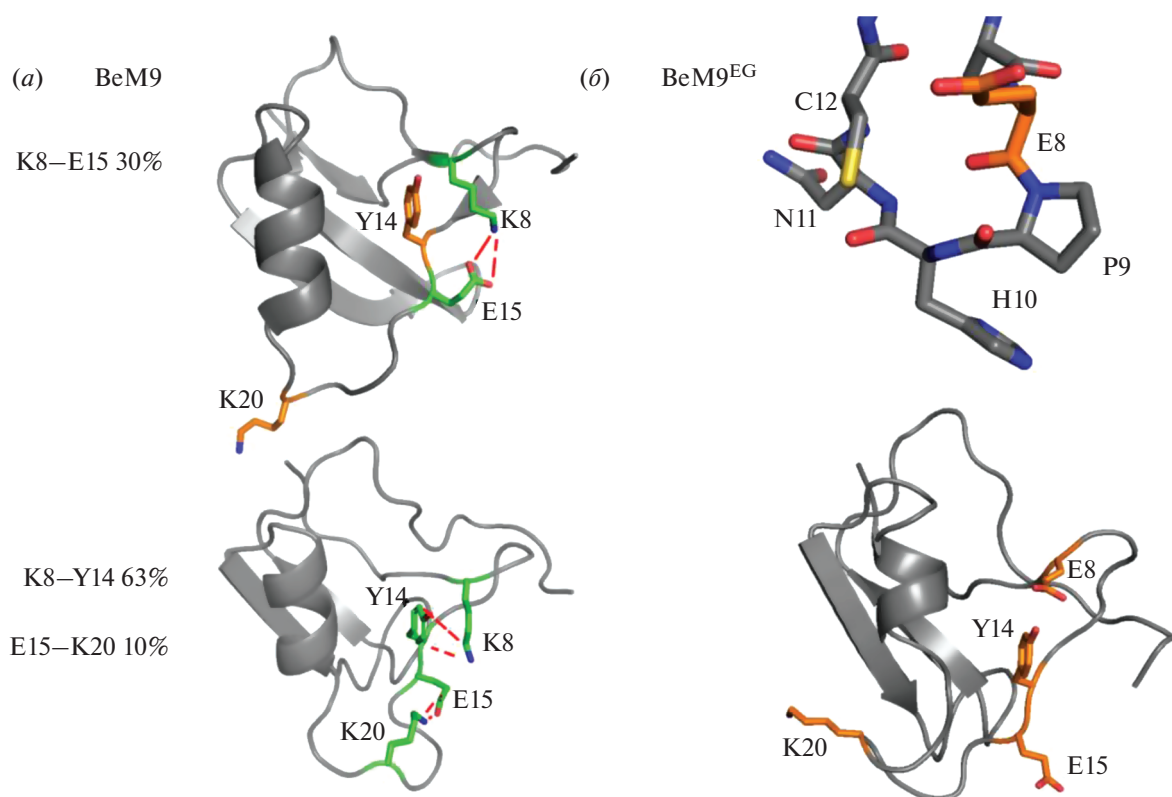
**Рис. 5.** Влияние мутации Y17G на структуру ВеМ9<sup>EG</sup>. (a) – Дифференциальная карта гидрофобных контактов между ВеМ9 и ВеМ9<sup>EG</sup> в окрестностях RT-петли и α-спирали, полученная вычитанием карт гидрофобных (нижняя левая часть карты) и стэкинг-взаимодействий (верхняя правая часть) ВеМ9 из ВеМ9<sup>EG</sup> (рис. 4). Голубым показана потеря гидрофобных контактов у ВеМ9<sup>EG</sup> по сравнению с ВеМ9, коричневым – их приобретение; интенсивность цвета отражает потерю или приобретение контактов между соответствующими остатками в долях времени от траектории (согласно шкале справа). Синим показана потеря стэкинг-взаимодействия Y17–Y23 у ВеМ9, красным – формирование стэкинг-взаимодействия Y14–Y23 у ВеМ9<sup>EG</sup>; на панелях (б, в) приведены типичные конформации, выбранные из расчетов молекулярной динамики; (б) – структура ВеМ9: зеленым показаны остатки, участвующие в стэкинг-взаимодействиях; оранжевым – не участвующие в данной структуре, но участвующие в ВеМ9<sup>EG</sup>; фиолетовым – остатки, у которых возрастает подвижность после мутации; серым – все другие остатки; (в) – структура ВеМ9<sup>EG</sup>: окраска аналогична ВеМ9, но оранжевым обозначены остатки, не участвующие в стэкинг-взаимодействиях у ВеМ9<sup>EG</sup>, но участвующие у ВеМ9; (д) – значения RMSF ВеМ9 (желтый) и ВеМ9<sup>EG</sup> (зеленый), усредненные по трем траекториям. Черная линия под графиком соответствует сердцевинному модулю, синим обозначены β-тяжи, красным – α-спираль, фиолетовым – окрестности замены Y17G, где после мутации возрастает подвижность (та же область, что и на панелях (б, в)).

вательность производных ВеМ9 не содержит остатков метионина, поэтому целевые токсины отщепляли от Тгх с помощью бромциана по описанной методике [19]. Для этого в последовательность химерных генов был специально введен метиониновый кодон непосредственно перед геном токсина. Очистку отщепленных от Тгх производных ВеМ9 проводили с помощью офВЭЖХ.

**Масс-спектрометрия.** Полипептиды анализировали с помощью времяпролетной MALDI-масс-спектрометрии с использованием спектрометра Ultraflex TOF-TOF (Bruker Daltonics,

США), анализ проводили, как описано ранее [20]. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксibenзойную кислоту (Sigma-Aldrich, США). Измерения проводили как в линейном, так и в рефлекторном режимах. Масс-спектры анализировали с помощью программного обеспечения Data Analysis 4.3 и Data Analysis Viewer 4.3 (Bruker, США).

**Электрофизиология.** Активность полученных производных сравнивали с исходным токсином ВеМ9 по эффекту в отношении ПЧНК, экспрессированных в ооцитах лягушки *X. laevis*. Выделе-



**Рис. 6.** Влияние мутации K8E на структуру VeM9. Зеленым показаны остатки K8, Y14, E15 и K20, участвующие в ионных и  $\pi$ -катионных взаимодействиях, оранжевым – они же, но не участвующие, серым – другие остатки. Красным пунктиром показаны взаимодействия между остатками. Приведенные конформации взяты из расчетов молекулярной динамики. (а) – Структура VeM9. Сверху показан солевой мостик K8–E15, снизу – солевой мостик E15–K20 и  $\pi$ -катионное взаимодействие K8–Y14. Слева от структур показаны доли времени моделирования, в течение которых наблюдаются соответствующие контакты, усредненные по трем траекториям; (б) – структура VeM9<sup>EG</sup>. Сверху показана структура RT-петли аналогично рис. 1б и 1в, снизу – общий вид структуры.

ние ооцитов, получение РНК, а также сбор и анализ данных проводили, как описано ранее [7, 10]. Мы использовали гены ряда изоформ ПЧНК млекопитающих: Na<sub>v</sub>1.2 и 1.4 крысы (r), Na<sub>v</sub>1.5 человека (h), Na<sub>v</sub>1.6 мыши (m), вспомогательных субъединиц  $\beta$ 1 и  $\beta$ 1, а также  $\alpha$ -субъединицы VgNa<sub>v</sub>1 и вспомогательной субъединицы TipE, клонированных из генома таракана *Blattella germanica* и дрозофилы. Для оценки эффективности токсинов мы использовали величину, равную отношению регистрируемой величины тока через мембрану ооцита спустя 30 мс после подачи тестового импульса к пиковому току ( $I_{30\text{ мс}}/I_{\text{min}}$ ). В случае канала Na<sub>v</sub>1.5 из-за быстрой кинетики его работы использовали отношение тока через 5 мс после тестового импульса к пиковому току ( $I_{5\text{ мс}}/I_{\text{min}}$ ). Все данные анализировали с помощью программного обеспечения pClamp Clampfit версии 10.4 (Molecular Devices, США) и Origin Pro версии 8.0 (OriginLab, США).

**Молекулярное моделирование.** Для сравнительного анализа использовали комплексы токсинов VeM9 и VeM9<sup>EG</sup> с каналами человека Na<sub>v</sub>1.4 и таракана VgNa<sub>v</sub>. Основой для моделирования стал комплекс химерного канала hNa<sub>v</sub>1.7-Na<sub>v</sub>Pas с Aah2 (PDB ID: 6NT4 [3]), куда путем пространственного совмещения на место Aah2 вставили исследуемые токсины, а на место hNa<sub>v</sub>1.7-Na<sub>v</sub>Pas – исследуемые каналы. Структуры hNa<sub>v</sub>1.4 и VgNa<sub>v</sub> получили на основе hNa<sub>v</sub>1.7-Na<sub>v</sub>Pas при помощи моделирования по гомологии в программе MODELLER v. 9.19 [21]. На основе шаблона построили 20 моделей и выбрали 3 модели с лучшим показателем оценивающей функции. Для минимизации энергии комплексов использовали вакуумные кубические ячейки (160 × 160 × 160 Å<sup>3</sup>), программу GROMACS 5.1.2 [22] и силовое поле amber99sb-ildn.ff [23].

Внутримолекулярные эффекты от мутаций в VeM9 оценивали с помощью сравнительного моделирования  $\alpha$ -подобного токсина VeM9 дикого



**Таблица 2.** Последовательности синтетических олигонуклеотидов для конструирования ДНК, кодирующей производные токсина ВеМ9

| Название  | Последовательность олигонуклеотида (5'–3')     |
|-----------|--|
| M9f1      | ATATGGTACCATGGCTCGTGACGCTTACATCGCTG            |
| M9f2*     | AACCGCACAACCTGCGTTTACGAATGCTACAACCCGAAAGGTTCTT |
| M9f2-2*   | AACCGCACAACCTGCGTTTACGAATGCGGCAACCCGAAAGGTTCTT |
| M9f3      | ACTGCAACGACCTGTGCACCCGAAAACGGTGCTGAATCTGGTTACT |
| M9f4      | GCCAGATCCTGGGTAATAACGGTAACGCTTGCTGGTGATCCA     |
| M9f5      | GCTGCCGGACAACGTTCCGATCCGTATCCCGGGTAAATGCC      |
| M9r1/2    | AAACGCAGTTGTGCGGTTAGCGATGTAAGCGTAC             |
| M9r2/3*   | TGCACAGGTCGTTGCAGTAAGAACCTTTCGGGTTGT           |
| M9r2/3-2* | TGCACAGGTCGTTGCAGTAAGAACCTTTCGGGTTGC           |
| M9r3/4    | ATTTACCCAGGATCTGGCAGTAACCAGATTCAGCAC           |
| M9r4/5    | GAACGTTGTCCGGCAGCTGGATGCACCAGCAAGC             |
| M9r       | GCATGGATCCCTAGTGGCATTACCCGGGATAC               |

Примечание: сайты рестрикции (KpnI в M9f1 и BamHI в M9r) выделены курсивным шрифтом, кодон метионина – жирным курсивным шрифтом, стоп-кодон – жирным шрифтом. Подчеркнуты нуклеотиды, отличающиеся от последовательности гена ВеМ9.

\* M9f2 и M9r2/3 использовали для синтеза гена ВеМ9Е, M9f2-2 и M9r2/3-2 – для синтеза гена ВеМ9ЕГ.

типа (PDB ID: 5MOU) и его двойного мутанта, специфичного к ПЧНК насекомых, – ВеМ9<sup>EG</sup>. Модель ВеМ9<sup>EG</sup> построили на основе гомологии с ВеМ9 в программе MODELLER v. 9.19 [21].

Для сравнения динамики молекул использовали метод молекулярной динамики. Радиус отсечки ван-дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий составил 10 и 12 Å соответственно. Для расчетов молекулярной динамики токсинов построили кубические ячейки (55 × 55 × 55 Å<sup>3</sup>) с моделью воды SPC [24], содержащие противоионы для электронейтральности и уравновешенные по энергии путем нагревания до 300 К в течение 100 пс. Молекулярную динамику проводили в периодических граничных условиях при  $T = 300$  К и  $P = 1$  бар, поддерживаемых при помощи термостата V-rescale [25] и баростата Берендсена [26] соответственно. Длина и шаг траектории составили 100 нс и 2 фс соответственно. Для каждой изучаемой молекулы было проведено по три независимых расчета для статистического сравнения.

**Молекулярные контакты.** Для расчета внутри- и межмолекулярных контактов использовали программное обеспечение IMPULSE (разработано Н.А. Крыловым, статья готовится к публикации). Все парные взаимодействия, обнаруженные в траекториях, классифицировали как водородные связи, гидрофобные контакты, солевые мостики (ионные связи), параллельный и Т-образный стэкинг на основании взаимного расположения, энергии взаимодействия и типа контактирующих остатков. Полученные данные перевели в формат точечных карт размером 66 × 66, где координаты точек соответствуют номерам остатков, а интенсивность окраски отражает долю вре-

мени существования контакта от времени моделирования (100 нс), собственным скриптом Python.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках выполненной работы мы попытались выяснить, какие механизмы стоят за наблюдаемым изменением селективности  $\alpha$ -подобного токсина ВеМ9 при внесении двух замен (K8E и Y17G) в его структуру. Мутации привели к неожиданному результату: ВеМ9<sup>EG</sup> потерял активность на каналах млекопитающих, оставшись активным на каналах насекомых, тогда как мы ожидали обратного эффекта. Чтобы выяснить причину такого изменения активности, мы сравнили модели комплексов ПЧНК млекопитающих и насекомых с ВеМ9 и ВеМ9<sup>EG</sup>, а также провели при помощи метода молекулярной динамики сравнительный анализ внутримолекулярных контактов в этих токсинах.

Анализ комплексов показал, что характер взаимодействия с ПЧНК изменяется: остаток K1439/1705 каналов формирует ионную связь с E15 у ВеМ9, а K8 во взаимодействии не участвует, тогда как в случае ВеМ9<sup>EG</sup> с K1439/1705 контактирует остаток E8. Однако петля S3–S4 и, в частности, остаток K1439/1705 консервативны, поэтому построенные модели могут объяснить изменение активности по отношению ко всем ПЧНК, но не изменение селективности токсина. Это показывает, что простые модели комплексов неинформативны, а причина изменения селективности может заключаться в аллостерических эффектах.

Анализ молекулярной динамики изолированных токсинов показал, что в области замены

Y17G ВеМ9<sup>EG</sup> имеет бóльшую подвижность. Это может объясняться потерей стэкингового контакта Y17–Y23, а также гибкостью основной цепи в области остатка глицина. Замена K8E разрушает переключаемую систему связей K8–E15–K20 и Y14–K8–E15, что может уменьшить стабильность RT-петли и ее окружения. В ВеМ9<sup>EG</sup> эти связи утеряны, поэтому RT-петля и ее окрестность становятся более подвижными, и система из двух стабильных конформаций исчезает. Мы предполагаем, что такая перестройка токсина в результате внесения мутаций и приводит в конечном итоге к нарушению стабильности его комплекса с ПЧНК млекопитающих. Дальнейшее детальное изучение структуры и конформационной мобильности модуля специфичности  $\alpha$ -NaTx может раскрыть природу “двойной” активности  $\alpha$ -подобных токсинов и способствовать созданию селективных лигандов на различные типы ПЧНК.

#### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-44-01015).

Я. Титгат благодарит за поддержку Исследовательский фонд Фландрии (FWO, гранты G0C2319N, G0A4919N и G0E7120N). С. Пеньёр выражает благодарность за финансирование Лёвенскому университету (PDM/19/164).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с лягушками проводились в соответствии с принципами ARRIVE (Animal Research: Reporting of *in Vivo* Experiments) и Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 18.III.1986).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Catterall W.A. // *Neurochem. Res.* 2017. V. 42. P. 2495–2504. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2314-9>
2. Capes D.L., Goldschen-Ohm M.P., Arcisio-Miranda M., Bezanilla F., Chanda B. // *J. Gen. Physiol.* 2013. V. 142. P. 101–112. <https://doi.org/10.1085/jgp.201310998>
3. Clairfeuille T., Cloake A., Infield D.T., Llongueras J.P., Arthur C.P., Li Z.R. // *Science.* 2019. V. 363. P. eaav8573. <https://doi.org/10.1126/science.aav8573>
4. Bosmans F., Tytgat J. // *Toxicon.* 2007. V. 49. P. 142–158.
5. Gordon D., Karbat I., Ilan N., Cohen L., Kahn R., Gilles N. // *Toxicon.* 2007. V. 49. P. 452–472. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.09.023>
6. King G.F. // *Pest Manag. Sci.* 2019. V. 75. P. 2437–2445. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.016>
7. Chugunov A.O., Koromyslova A.D., Berkut A.A., Peigneur S., Tytgat J., Polyansky A.A. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. P. 19014–19027. <https://doi.org/10.1002/ps.5452>
8. Pashkov V.S., Anh Hoang N., Maiorov V.N., Bystrov V.F. // *Peptides.* 1988. P. 77–78. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.431650>
9. Pashkov V.S., Khoang N.A., Maiorov V.N., Bystrov V.F. // *Bioorg. Khim.* 1986. V. 12. P. 1306–1316. [https://doi.org/10.1007/978-94-010-9595-2\\_21](https://doi.org/10.1007/978-94-010-9595-2_21)
10. Kuldyshev N.A., Berkut A.A., Peigneur S., Tytgat J., Grishin E.V., Vassilevski A.A. // *FEBS Lett.* 2017. V. 591. P. 3414–3420. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12839>
11. Kuldyshev N.A., Mineev K.S., Berkut A.A., Peigneur S., Arseniev A.S., Tytgat J. // *Proteins.* 2018. V. 86. P. 1117–1122. <https://doi.org/10.1002/prot.25583>
12. Arnon T., Potikha T., Sher D., Elazar M., Mao W., Tal T. // *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2005. V. 35. P. 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.11.005>
13. Watson J.D., Milner-White E.J. // *J. Mol. Biol.* 2002. V. 315. P. 171–182. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5227>
14. Housset D., Habersetzer-Rochat C., Astier J.P., Fontecilla-Camps J.C. // *J. Mol. Biol.* 1994. V. 238. P. 88–103. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1270>
15. LaVallie E.R., DiBlasio E.A., Kovacic S., Grant K.L., Schendel P.F., McCoy J.M. // *Biotechnology.* 1993. V. 11. P. 187–193. <https://doi.org/10.1038/nbt0293-187>
16. Shlyapnikov Y.M., Andreev Y.A., Kozlov S.A., Vassilevski A.A., Grishin E.V. // *Protein Expr. Purif.* 2008. V. 60. P. 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.03.011>
17. Studier F.W., Moffatt B.A. // *J. Mol. Biol.* 1986. V. 189. P. 113–130. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2)
18. Hochuli E., Bannwarth W., Döbeli H., Gentz R., Stüber D. // *Nat. Biotechnol.* 1988. V. 6. P. 1321–1325. <https://doi.org/10.1038/nbt1188-1321>
19. Andreev Y.A., Kozlov S.A., Vassilevski A.A., Grishin E.V. // *Anal. Biochem.* 2010. V. 407. P. 144–146. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.07.023>
20. Kuzmenkov A.I., Sachkova M.Y., Kovalchuk S.I., Grishin E.V., Vassilevski A.A. // *Biochem. J.* 2016. V. 473. P. 2495–2506. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160436>
21. Webb B., Sali A. // *Curr. Protoc. Bioinformatics.* 2016. V. 54. P. 5.6.1–5.6.37. <https://doi.org/10.1002/cpbi.3>

22. *Abraham M.J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J.C., Hess B.* // SoftwareX. 2015. V. 1–2. P. 19–25.  
<https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
23. *Lindorff-Larsen K., Piana S., Palmo K., Maragakis P., Klepeis J.L., Dror R.O.* // Proteins. 2010. V. 78. P. 1950–1958.  
<https://doi.org/10.1002/prot.22711>
24. *Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D., Impey R.W., Klein M.L.* // J. Chem. Phys. 1983. V. 79. P. 926–935.  
<https://doi.org/10.1063/1.445869>
25. *Bussi G., Donadio D., Parrinello M.* // J. Chem. Phys. 2007. V. 126. P. 014101.  
<https://doi.org/10.1063/1.2408420>
26. *Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., van Gunsteren W.F., DiNola A., Haak J.R.* // J. Chem. Phys. 1984. V. 81. P. 3684–3690.  
<https://doi.org/10.1063/1.448118>

## Derivative of Scorpion Neurotoxin BeM9 Is Selective for Insect Voltage-Gated Sodium Channels

M. A. Chernykh\*, N. A. Kuldyshev\*, S. Peigneur\*\*, A. A. Berkut\*, J. Tytgat\*\*, R. G. Efremov\*, \*\*\*, A. A. Vassilevski\*, \*\*\*, #, and A. O. Chugunov\*, \*\*\*,

#E-mail: [avas@ibch.ru](mailto:avas@ibch.ru)

\**Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia*

\*\**KU Leuven, ON II, Herestraat 49, box 922 Leuven, 3000 Belgium*

\*\*\**Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University) Institutskiy per. 9, Dolgoprudny, 141701 Russia*

Scorpion  $\alpha$ -neurotoxins are small proteins able to inhibit the inactivation of voltage-gated sodium channels. They can selectively act on mammalian channels (mammal toxins) or insect channels (insect toxins) or affect both types of channels ( $\alpha$ -like toxins). Currently no model has been proposed to fully explain the dependence of selectivity upon amino acid sequence, but some patterns have already been established. Thus, most mammal toxins have an aspartic acid residue in position 8, which is involved in the formation of the nest motif, but it is still not clear whether this residue interacts directly with channels. The objective of our study was to obtain a derivative of the  $\alpha$ -like toxin BeM9 with the replacement of lysine in position 8 by glutamate (K8E), changing the charge, but excluding the formation of the nest motif. In addition, we replaced the tyrosine in position 17 with glycine (Y17G), which is characteristic of mammal toxins. Surprisingly, the double-mutant derivative BeM9<sup>EG</sup> lost its activity on mammalian channels, becoming an insect toxin. To explain these changes, we constructed models of BeM9 and BeM9<sup>EG</sup> complexes with channels, and also performed molecular dynamics of isolated toxins. Analysis of intermolecular contacts in the complexes did not explain the reason for the selectivity change. Nevertheless, the structure of intramolecular contacts and data on molecular mobility indicate an important role of residues K8 and Y17 in stabilizing a certain conformation of BeM9 loops. We assume that the replacement of these residues allosterically affects the efficiency of toxin binding to channels.

*Keywords: neurotoxins, voltage-gated sodium channels, protein engineering, molecular dynamics*