

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕПТИДНЫХ ЛИГАНДОВ
КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ MEKTX13-2 И MEKTX13-3 ИЗ ЯДА
СКОРПИОНА *MESOBUTHUS EUPEUS*

© 2019 г. А. И. Кузьменков¹, С. Пеньёр², Я. Титгат², А. А. Василевский^{1, *}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Москва, Россия

²Лёвенский университет, Лёвен, Бельгия

*E-mail: avas@ibch.ru

Поступила в редакцию 13.08.2019 г.

После доработки 04.09.2019 г.

Принята к публикации 04.09.2019 г.

Токсины скорпионов, блокирующие калиевые каналы, в настоящее время служат незаменимыми молекулярными инструментами исследований в нейробиологии. При этом наблюдается острая нехватка соединений, селективно воздействующих на определенные изоформы каналов. Ранее из яда Среднеазиатского скорпиона *Mesobuthus eupeus* мы выделили целый ряд токсинов, воздействующих на потенциал-чувствительные калиевые каналы. Далее мы изучили активность двух сходных токсинов *M. eupeus*, получивших названия MeKTx13-2 и MeKTx13-3, на панели калиевых каналов и обнаружили, что они характеризуются селективным действием в отношении изоформы $K_v1.1$, экспрессия которой характерна для центральной нервной системы млекопитающих. Мы полагаем, что эти результаты позволят получить производные токсинов с повышенной селективностью к $K_v1.1$, которые будут востребованы в исследованиях нервной системы.

Ключевые слова: ионный канал, калиевый канал, токсин, скорпион, яд, K_v , KTx

DOI: 10.1134/S0869813919110074

Природные токсины, выделяемые из ядовитых животных, давно зарекомендовали себя как эффективные молекулярные исследовательские инструменты, используемые в различных областях физиологии, биохимии и нейробиологии. Токсины обладают значительным потенциалом в качестве лекарственных препаратов нового поколения и диагностических инструментов [1, 2]. Модифицированные изотопными и флуоресцентными метками производные токсинов были успешно применены в десятках исследований по идентификации и выделению новых рецепторов, клеточной и тканевой локализации ионных каналов, а также для поиска новых лигандов [3]. Особая ценность природных токсинов состоит в их непревзойденной селективности и способности с высокой аффинностью взаимодействовать с определенной молекулярной мишенью [4].

Одним из наиболее традиционных источников токсинов как молекулярных инструментов выступает яд скорпионов, который может содержать десятки и даже сотни индивидуальных соединений. По способности воздействовать на определенную молекулярную мишень токсины скорпионов делятся на несколько групп, главными из которых являются лиганды натриевых (NaTx) и калиевых каналов (KTx) [5]. В большинстве случаев эти токсины представляют собой полипептиды длиной от

20 до 75 аминокислотных остатков с 2–4 внутримолекулярными дисульфидными связями [6, 7]. В ходе длительной эволюции сформировалось характерное разнообразие структуры компонентов яда скорпионов, а также проявляемых ими физиологических эффектов. Наибольшее число известных пептидных молекул из яда скорпионов имеют укладку типа $CS\alpha/\beta$ (цистеин-стабилизированные α -спираль и β -слой), а их действие сводится к активации потенциал-чувствительных натриевых (Na_v) и ингибированию потенциал-чувствительных калиевых каналов (K_v) [7–9].

Согласно базе данных Kalium (<https://kaliumdb.org/>), в яде различных скорпионов было идентифицировано порядка 200 полипептидных лигандов калиевых каналов [10, 11]. Около половины этих молекул либо не получили никакой физиологической характеристики, либо были протестированы лишь на одной изоформе каналов. Два токсина (MeKTx13-2 и MeKTx13-3) были выделены нами ранее из яда пестрого скорпиона *Mesobuthus eupeus*, а их физиологическая активность была продемонстрирована лишь на одной изоформе каналов [12]. В данной работе мы провели фармакологическое профилирование MeKTx13-2 и MeKTx13-3 на шести изоформам калиевых каналов млекопитающих ($K_v1.1$ –1.6), а также установили значения концентрации полунгибирования (IC_{50}) для обоих токсинов и каналов, на которых наблюдался выраженный эффект. В результате мы показали, что MeKTx13-2 и MeKTx13-3 являются селективными в отношении $K_v1.1$ – одной из наиболее распространенных и важных изоформ в нервной системе [13].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксклюзионная хроматография

Разделение яда проводили согласно методикам, опубликованным ранее [14]. Высушенный лиофильно образец яда скорпиона *M. eupeus* растворяли в 500 мкл элюирующего раствора, содержащего 0.1% (v/v) трифторуксусной кислоты (ТФУ) и 10% (v/v) ацетонитрила, и наносили на колонку TSK 2000SW (7.5 × 600 мм, 125 Å, 10 мкм; Tosoh Bioscience). Элюирующий раствор подавали на колонку со скоростью 0.5 мл/мин, предварительно дегазировав. Детекцию осуществляли по оптической плотности элюата при 210 нм с помощью детектора Waters 2489 и с регистрацией на компьютере с установленным программным комплексом МультиХром.

Обращенно-фазовая высокоскоростная жидкостная хроматография (ОФ-ВЭЖХ)

После эксклюзионной хроматографии дальнейшее фракционирование осуществлялось на аналитической колонке Vydac 218TP54 C_{18} (4.6 × 250 мм, 300 Å, 5 мкм; Separations Group) с использованием градиентного хроматографа Waters 1525. Хроматографию проводили в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (от 0 до 60%, v/v) в присутствии 0.1% ТФУ в течение 60 мин со скоростью элюции 1 мл/мин. Второй раунд ОФ-ВЭЖХ проводили на той же колонке в линейном градиенте раствора, содержащего 20% (v/v) изопропанола, 30% ацетонитрила и 0.1% ТФУ, в течение 90 мин со скоростью элюции 1 мл/мин. Детекцию осуществляли по оптической плотности элюата при 210 и 280 нм с регистрацией на компьютере с установленной программой Breeze 2.0.

Масс-спектрометрия

Измерение молекулярных масс токсинов проводили с помощью метода матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) масс-спектрометрии на приборе Ultraflex TOF-TOF (Bruker Daltonik) с идентификацией положительных ионов в рефлекторном режиме, как описано в [15]. В качестве матрицы

использовали 2,5-дигидроксibenзойную кислоту или α -циано-4-гидроксикоричную кислоту. Для обработки результатов использовалось программное обеспечение Data Analysis 4.3 и Data Analysis Viewer 4.3 (Bruker).

Определение концентрации пептидов. УФ-спектрофотометрия

Для получения спектров поглощения веществ в УФ-области их высушивали лиофильно, после чего растворяли в 0.5 мл воды, полученной на установке Milli-Q (Millipore). В работе использовали спектрофотометр UV-1800 (Hitachi); длина оптического пути кюветы – 1 см, раствором сравнения служила вода. Концентрацию MeKTx13-2 и MeKTx13-3 определяли по спектру поглощения по формулам (1) и (2) соответственно:

$$C_A = (A_{274.5} - A_{320})/\varepsilon_Y, \quad (1)$$

$$C_A = (A_{257} - A_{320})/\varepsilon_F, \quad (2)$$

где C_A – концентрация (моль/л) пептидов, содержащих ароматические аминокислоты; $A_{274.5}$, A_{257} и A_{320} – оптическая плотность раствора при 274.5, 257 и 320 нм; ε_Y – молярный коэффициент поглощения тирозина при 274.5 нм ($1340 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), ε_F – молярный коэффициент поглощения фенилаланина при 257 нм ($200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Экспрессия генов, кодирующих K_v , в ооцитах *Xenopus laevis*

Все процедуры были выполнены в строгом соответствии с рекомендациями руководства ARRIVE по разработке, анализу и представлению научных исследований, выполненных на животных, и Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 18.03.1986).

Экспрессию генов каналов и электрофизиологические исследования проводили согласно опубликованным протоколам [16]. Для экспрессии различных изоформ α -субъединицы K_v каналов (rK_v1.1, rK_v1.2, hK_v1.3, rK_v1.4, rK_v1.5 и rK_v1.6, где префикс г обозначает канал крысы, h – канал человека) в ооцитах шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* соответствующие гены были клонированы в составе вектора pSP64T. Далее вектор линеаризовали по сайтам рестрикции EcoRI (rK_v1.1), SphI (rK_v1.2), NotI (hK_v1.3 и rK_v1.4), SalI (rK_v1.5), NdeI (rK_v1.6). Кэпированные молекулы мРНК синтезировались с помощью системы для транскрипции mMACHINE T7 (Thermo Fisher Scientific). Ооциты на V–VI стадии развития изымались из яичников предварительно анестезированной самки лягушки. 50 нл раствора РНК, кодирующей α -субъединицы K_v каналов, с концентрацией 1 нг/нл вводили в ооциты с помощью микроинжектора Nanoject II (Drummond), после чего клетки инкубировали 2–4 дня в растворе для инкубации ND96 (mM): 96 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, 2 MgCl₂, 5 HEPES, pH 7.4 с добавлением гентамицина (50 мг/л).

Электрофизиологические исследования

Эксперименты проводили методом двухэлектродной фиксации потенциала на электрофизиологической установке Geneclamp 500 (Molecular Devices). Все измерения проводились при комнатной температуре (18–22°C). Регистрация токов через мембрану ооцитов, экспрессирующих ту или иную изоформу K_v , проводилась спустя 1–4 дня после инъекции мРНК. В качестве раствора, в который помещались ооциты во время записи токов, использовали ND96. Electrodes были заполнены 3 M раствором KCl, их сопротивление составляло 0.7–1.5 МОм. Вычитание тока утечки было выполнено с использованием протокола –P/4. Потенциал покоя

был установлен на -90 мВ. Ионные токи через K_v (I_K) вызывались деполяризацией в течение 500 мс до 0 мВ с последующим импульсом длительностью 500 мс до -50 мВ. Чтобы исследовать вольтамперную характеристику, токи вызывали последовательной деполяризацией мембраны от потенциала покоя (-90 мВ) с шагом 10 мВ. Зависимость значений I_K от напряжения анализировалась с помощью уравнения Больцмана:

$$I_K/I_{\max} = \{1 + \exp[(V_1 - V)/k]\}^{-1},$$

где I_{\max} представляет максимальное I_K , V_1 – напряжение, соответствующее половине максимального тока, k – коэффициент наклона.

Чтобы оценить концентрационную зависимость ингибирующего эффекта, вызванного токсином, была построена кривая с помощью уравнения Хилла:

$$y = 100/[1 + (IC_{50}/[\text{токсин}])^h],$$

где y – процент ингибирования каналов, вызванного токсином, IC_{50} – концентрация полумаксимального ингибирования, $[\text{токсин}]$ – концентрация токсина и h – коэффициент Хилла.

Сравнение двух выборочных средних было выполнено с использованием парного критерия Стьюдента. Все данные получены в как минимум трех независимых измерениях ($n \geq 3$) и представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Обработка полученных результатов проводилась с использованием программы Origin (OriginLab Corporation).

Молекулярное моделирование

Молекулярная модель MeКТх13-2 была построена с помощью программы Modeller 9.14 (оболочка UCSF Chimera 1.10.1) [17, 18], в качестве шаблона использовалась пространственная структура токсина OSK1 (PDB ID: 1SCO) из скорпиона *Orthochirus scrobiculosus* [19]. Визуализация пространственных структур осуществлялась посредством программы PyMOL 1.7.4 (Schrödinger).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Идентификация и выделение MeКТх13-2 и MeКТх13-3

Выделение пептидных лигандов калиевых каналов из яда скорпиона *M. eurus* проводилось согласно стандартному протоколу с использованием многостадийной хроматографии. Подробное описание стратегии разделения яда и идентификации токсинов приведено в предыдущих работах [12, 20]. На первом этапе цельный яд был разделен на три грубые фракции с помощью эксклюзионной хроматографии (I–III, рис. 1А). Искомые компоненты содержались во фракции II, поэтому она была отобрана для дальнейшего разделения. Для выделения активных пептидов фракция II была подвержена разделению с помощью ОФ-ВЭЖХ на субфракции (рис. 1Б). Искомые MeКТх13-2 и MeКТх13-3 содержались в субфракциях II-3 и II-5 соответственно.

Второй раунд ОФ-ВЭЖХ позволил выделить активные компоненты в индивидуальном виде. Субфракция II-3 содержала единственный активный компонент – пептид MeКТх13-2 (рис. 1В). В субфракции II-5 находились два пептидных токсина, один из которых искомый MeКТх13-3 (рис. 1Г). Гомогенность полученных соединений была подтверждена масс-спектрометрически. Концентрация пептидов была рассчитана с помощью УФ-спектроскопии, из 1 мг цельного яда мы получили 0.25 нмоль MeКТх13-2 и 0.85 нмоль MeКТх13-3.

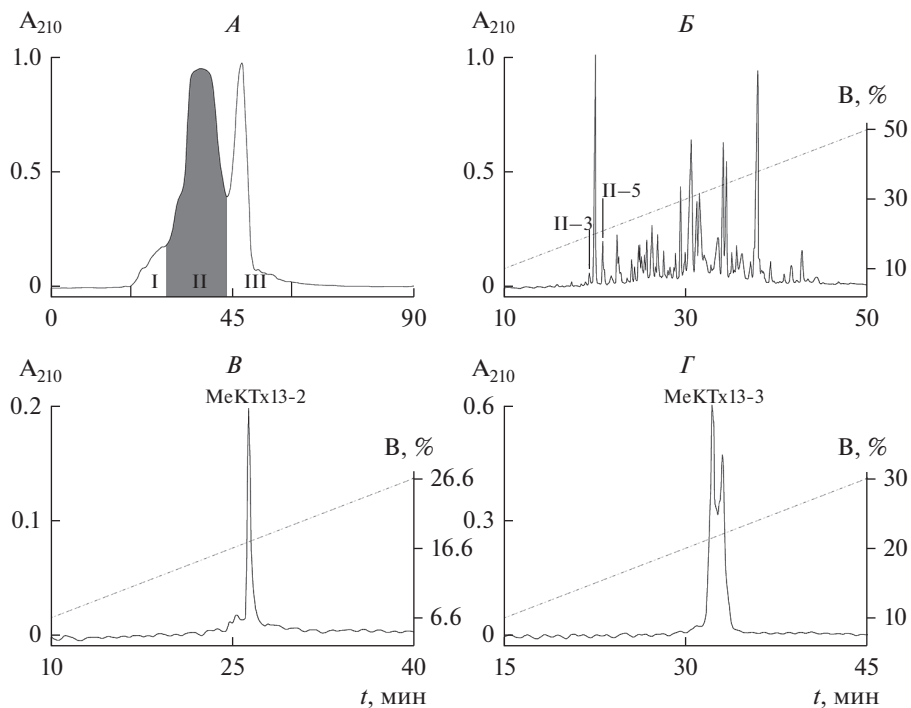


Рис. 1. Выделение токсинов MeKTx13-2 и MeKTx13-3 из яда скорпиона *M. eurusus*. *А* – профиль эксклюзионной хроматографии 1 мг сухого яда на колонке TSK 2000SW. Отобранные фракции отмечены римскими цифрами I–III. Фракция II, содержащая искомые вещества, была отобрана для дальнейшего анализа. *Б* – профиль разделения фракции II с помощью ОФ-ВЭЖХ на колонке Yudas C₁₈ в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0–60%). На профиле показаны субфракции, содержащие MeKTx13-2 (II-3) и MeKTx13-3 (II-5). *В*, *Г* – профили финального раунда очистки MeKTx13-2 и MeKTx13-3 соответственно на колонке Yudas C₁₈, в качестве подвижной фазы использовался раствор 20%-ного изопропанола и 30%-ного ацетонитрила.

Аминокислотные последовательности токсинов, а также посттрансляционные модификации были установлены на предыдущем этапе работы. Оба пептида содержат по 37 аминокислотных остатков, С-концевой остаток амидирован (рис. 2). Характерное расположение шести остатков цистеина позволяет предполагать каноничное замыкание внутримолекулярных дисульфидных связей, способствующих пространственной укладке типа CS α / β . MeKTx13-2 и MeKTx13-3 были классифицированы как α -КТх3.18 и α -КТх3.19 соответственно согласно номенклатуре Титгата–Поссани и базе данных полипептидных лигандов калиевых каналов Kalium (<https://kaliumdb.org/>) [10, 11, 21]. В базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org/>) [22] токсины получили идентификационные номера C0NHJQ4 и C0NHJQ6 соответственно. Токсин MeKTx13-3 оказался идентичен по аминокислотной последовательности токсину VmКТХ (α -КТх3.6, UniProt ID: Q9NII7) из родственного скорпиона *Mesobuthus martensii* [23].

Электрофизиологическая характеристика MeKTx13-2 и MeKTx13-3

Характеристика активности MeKTx13-2 и MeKTx13-3 проводилась посредством электрофизиологического исследования на ряде изоформ K_v методом двухэлек-

Название	Kalium	UniProt	Аминокислотная последовательность	Мм, Да
OSK1	α -КТх 3.7	P55896	GVIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	4205
MeКТх13-2	α -КТх 3.18	C0HJQ4	-REIEVVKCKGSKQCLQSKKEAGMTYGKCMNGKCNCTPK-NH ₂	4047
MeКТх13-3	α -КТх 3.19	C0HJQ6	-VGINVKCKHSGCLKPKKDAGMRFGKCMNGKCDCTPK-NH ₂	3962

Рис. 2. Первичная структура пептидов OSK1, MeКТх13-2 и MeКТх13-3. Указаны классификаторы в базе данных Kalium, идентификационные номера в базе данных UniProt, приведены полные аминокислотные последовательности, показано предполагаемое расположение цистинов, а также отмечены измененные молекулярные массы (Мм) токсинов. Серым цветом отмечены аминокислотные остатки MeКТх13-2 и MeКТх13-3, отличающиеся от OSK1, пространственная структура которого использовалась для молекулярного моделирования.

тродной фиксации потенциала. На рис. 3 приведены записи токов через гомотетрамерные калиевые каналы различных изоформ до и после добавления токсинов в концентрации 1 мкМ. Оба пептида частично или полностью ингибировали все каналы, кроме K_v1.4 и K_v1.5. Для всех изоформ K_v, на которых наблюдался эффект, были построены кривые концентрационной зависимости ингибирования (рис. 3, справа) и рассчитаны средние значения концентрации полуингибирования (IC₅₀, табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Место MeКТх13-2 и MeКТх13-3 среди блокаторов калиевых каналов из яда скорпионов

Как уже было отмечено выше, в настоящее время известно порядка 200 токсинов скорпионов, относящихся к лигандам калиевых каналов (КТх). Практически все эти полипептиды реализуют свой блокирующий эффект путем физического “закупоривания” поры ионного канала, подобно бутылочной пробке. Согласно базе данных Kalium, базирующейся на улучшенной классификации Титгата–Поссани, выделяют семь семейств КТх: α -, β -, γ -, δ -, ϵ -, κ - и λ -КТх. В основе классификации, как правило, лежат структурные особенности токсинов, однако также могут учитываться их функциональные характеристики [7, 10, 11, 21].

MeКТх13-2 (α -КТх3.18) и MeКТх13-3 (α -КТх3.19) относятся к наиболее представленному семейству α -КТх и к подсемейству α -КТх3, в которое входят такие хорошо изученные токсины, как калиотоксин-1 (КТХ-1, α -КТх3.1, UniProt ID: P24662) из мавританского толстохвостого скорпиона *Androctonus mauritanicus*, агитоксин-2 (AgТх-2, α -КТх3.2, P46111) из палестинского желтого скорпиона *Leiurus quinquestriatus hebraeus* и OSK1 (α -КТх3.7, P55896) из Среднеазиатского черного скорпиона *Orthochirus scrobiculosus* [24–26]. Представители данного подсемейства содержат 37 или 38 аминокислотных остатков, шесть из которых – остатки цистеина, образующие три внутримолекулярные дисульфидные связи с расположением: C¹–C⁴,

Таблица 1. Значения IC₅₀ для MeКТх13-2 и MeКТх13-3, определенные на различных каналах

Токсин	K _v 1.1	K _v 1.2	K _v 1.3	K _v 1.6
	IC ₅₀ , нМ			
MeКТх13-2	90.3 ± 2.2	2677.7 ± 101.2	311.7 ± 19.7	266.3 ± 23.0
MeКТх13-3	1.9 ± 0.2	105.9 ± 14.6	8.9 ± 0.9	63.4 ± 4.5

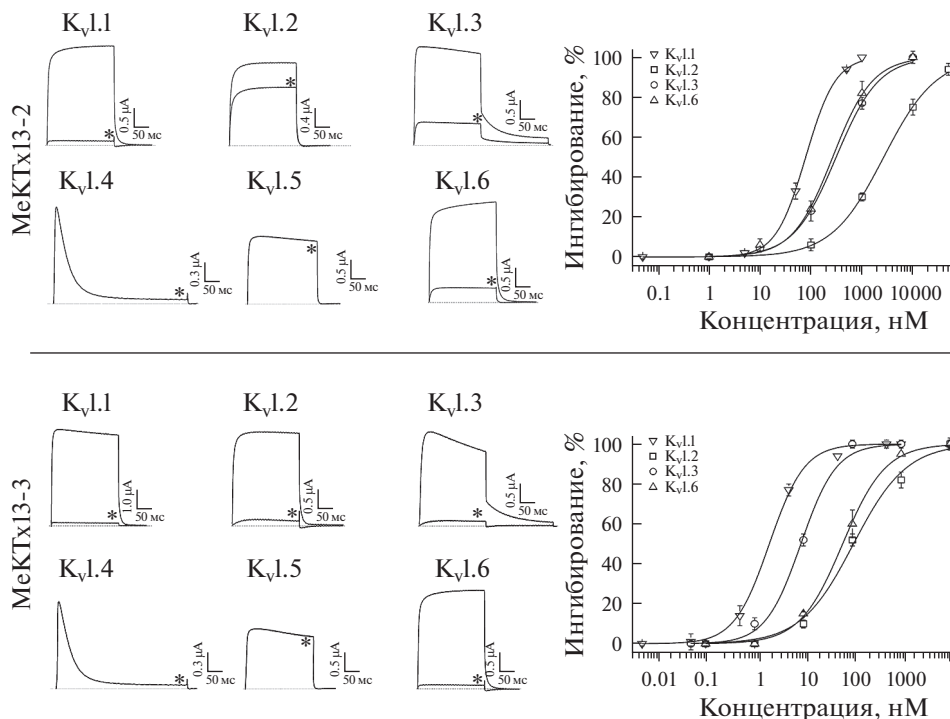


Рис. 3. Физиологическая характеристика MeKTx13-2 и MeKTx13-3. Слева представлены записи тока через K_v каналы в контроле и после добавления 1 мкМ пептидов (отмечены звездочками). Справа показаны кривые концентрационной зависимости ингибирования для токсинов, полученные на $K_v1.1-1.3$ и $K_v1.6$.

C^2-C^5 и C^3-C^6 (рис. 2). Некоторые из них, включая MeKTx13-2 и MeKTx13-3, имеют распространенную для токсинов скорпионов посттрансляционную модификацию – C-концевое амидирование [7].

С точки зрения пространственной структуры MeKTx13-2 и MeKTx13-3 – классические представители пептидов, формирующих укладку типа $CS\alpha/\beta$ (цистеин-стабилизированные α -спираль и β -слой). MeKTx13-3, как отмечалось выше, идентичен токсину VmKTX, для которого трехмерная структура была изучена ранее (PDB ID: 1VKT) [27]. Пространственная структура MeKTx13-2 может быть предсказана с достаточно высокой точностью с помощью гомологичного моделирования (рис. 4), поскольку его аминокислотная последовательность сходна на ~70% с OSK1, структура которого известна (PDB ID: 1SCO) [19]. В случае консервативности пространственной укладки и наличия разрешенной структуры близкого гомолога использование метода молекулярного моделирования кажется весьма эффективным и рациональным.

MeKTx13-2 и MeKTx13-3 – селективные лиганды $K_v1.1$

Для обоих токсинов была обнаружена активность на $K_v1.1$, 1.2, 1.3 и 1.6, в то время как на $K_v1.4$ и 1.5 эффект отсутствовал (табл. 1, рис. 3). В настоящее время не было найдено ни одного пептидного блокатора калиевых каналов из яда скорпионов, который бы проявлял активность по отношению к $K_v1.4$ или 1.5 [10, 11]. Анализ

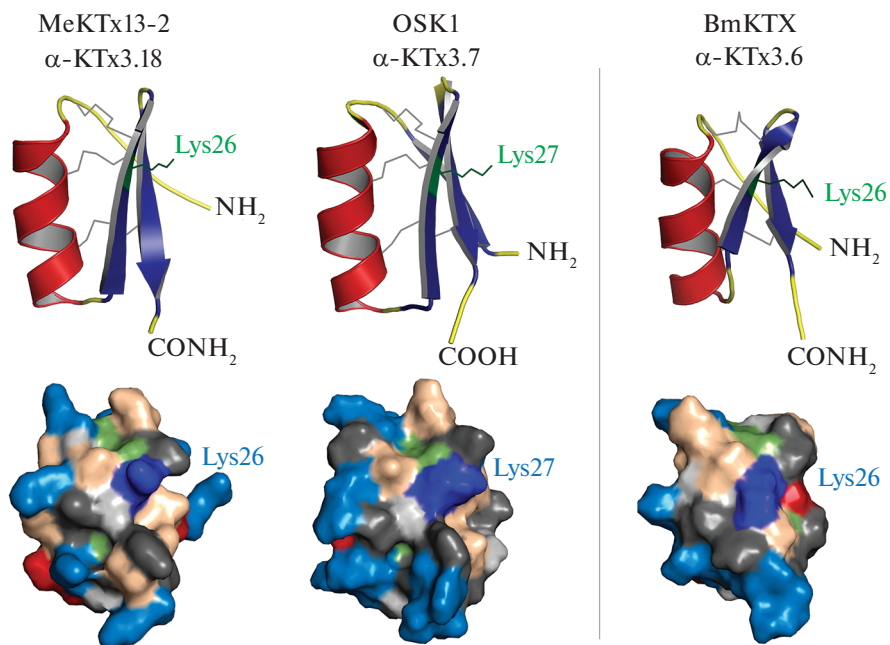


Рис. 4. Модель пространственной структуры MeKTx13-2 и структура OSK1, использованного в качестве шаблона, а также структура MeKTx13-3 (BmKTx). Сверху представлены ленточные модели, где элементы вторичной структуры окрашены: α -спирали – красным, β -тяжи – синим, петлевые участки – желтым. Серым обозначены дисульфидные связи. Зеленым выделен остаток лизина, который является ключевым во взаимодействии КТх с порой калиевых каналов. Снизу показаны молекулярные поверхности, где темно-серым цветом обозначены гидрофобные аминокислотные остатки, светло-серым – остатки глицина, зеленым – цистеина, бежевым – гидрофильные нейтральные аминокислотные остатки, красным – отрицательно заряженные, голубым – положительно заряженные остатки. Ключевой остаток лизина обозначен синим цветом.

профиля селективности MeKTx13-2 и MeKTx13-3 показывает, что эти пептиды проявляют специфичность по отношению к изоформе $K_v1.1$. Стоит отметить, что BmKTx, идентичный MeKTx13-3, ранее исследовался на панели K_v [28], однако только в концентрации 2 мкМ, что не позволило изучить его селективность.

Согласно данным литературы ранее был описан всего один токсин из яда скорпиона, который также проявлял селективность к $K_v1.1$, а именно хонготоксин-1 (HgTx1, α -КТх2.5, P59847) из Центральноамериканского скорпиона *Centruroides limbatus* [29]. В яде других животных $K_v1.1$ -селективные токсины, по-видимому, также встречаются крайне редко. Так, помимо скорпионов, лишь в яде двух морских анемонов: *Bunodosoma granuliferum* и *Anthopleura elegantissima* – были идентифицированы полипептиды BgK (κ -actitoxin-Bgr1a, P29186) и APEKTx1 (κ PI-actitoxin-Ael3a, P86862) соответственно, проявляющие селективность в отношении $K_v1.1$ [16, 30]. Последний токсин можно назвать несомненным лидером, поскольку для него активность была показана лишь на изоформу $K_v1.1$ ($IC_{50} = 0.9$ нМ) и не обнаружена для других изоформ K_v вплоть до концентрации 1 мкМ.

Для оценки специфичности токсинов по отношению к той или иной изоформе канала (в нашем случае $K_v1.1$) удобно использовать коэффициенты селективности: отношения значений IC_{50} (или K_d) для двух каналов (табл. 2) [31]. Данный пара-

Таблица 2. Пептидные токсины с наибольшей селективностью к $K_v1.1$. Для перечисленных токсинов показаны соотношения IC_{50} (или K_d) в отношении указанных пар каналов

Токсин	$K_v1.2/K_v1.1$	$K_v1.3/K_v1.1$	$K_v1.6/K_v1.1$
Скорпионы			
MeКТх13-2	30	3	3
MeКТх13-3	56	5	33
HgTX1	5	3	194
Морские анемоны			
АРЕКТх1	>1111	>1111	>1111
BgK	3	2	—

метр наглядно оценивает специфичность каждого токсина к $K_v1.1$. Наибольшие значения коэффициентов селективности ожидаемо имеет АРЕКТх1, однако MeКТх13-2 и MeКТх13-3 также показывают достаточно высокий результат. С точки зрения разработки новых лигандов K_v токсины скорпионов имеют приоритет, поскольку именно их структурно-функциональные особенности исследованы лучше всего, кроме того, известна пространственная структура комплекса токсина скорпиона и K_v [32]. Мы заключаем, что изученные нами токсины представляют собой удобный шаблон для дальнейшего рационального дизайна и получения селективных лигандов $K_v1.1$.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 18-74-00125).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Norton R.S. Enhancing the therapeutic potential of peptide toxins. *Expert Opin. Drug Discov.* 12: 611–623. 2017.
2. Cohen-Inbar O., Zaaroor M. Glioblastoma multiforme targeted therapy: The Chlorotoxin story. *J. Clin. Neurosci.* 33: 52–58. 2016.
3. Kuzmenkov A.I., Vassilevski A.A. Labelled animal toxins as selective molecular markers of ion channels: Applications in neurobiology and beyond. *Neurosci. Lett.* 679: 15–23. 2018
4. King G.F. (ed.) *Venoms to Drugs*. 2015.
5. Housley D.M., Housley G.D., Liddell M.J., Jennings E.A. Scorpion toxin peptide action at the ion channel subunit level. *Neuropharmacology.* 127: 46–78. 2017.
6. Rodríguez de la Vega R.C., Possani L.D. Overview of scorpion toxins specific for Na^+ channels and related peptides: Biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon.* 46: 831–844. 2005.
7. Kuzmenkov A.I., Grishin E.V., Vassilevski A.A. Diversity of potassium channel ligands: Focus on scorpion toxins. *Biochemistry (Mosc.)*. 80: 1764–1799. 2015.
8. Mouhat S., Jouirou B., Mosbah A., De Waard M., Sabatier J.-M. Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochem. J.* 378: 717–26. 2004.
9. Quintero-Hernández V., Jiménez-Vargas J.M., Gurrola G.B., Valdivia H.H., Possani L.D. Scorpion venom components that affect ion-channels function. *Toxicon.* 76: 328–342. 2013.
10. Kuzmenkov A.I., Krylov N.A., Chugunov A.O., Grishin E.V., Vassilevski A.A. Kalium: a database of potassium channel toxins from scorpion venom. *Database (Oxford)*. 2016. pii: baw056.
11. Tabakmakher V.M., Krylov N.A., Kuzmenkov A.I., Efremov R.G., Vassilevski A.A. Kalium 2.0, a comprehensive database of polypeptide ligands of potassium channels. *Sci. Data.* 6: 73. 2019.
12. 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. Variability of potassium channel blockers in *Me-*

- sobuthus eupeus* scorpion venom with focus on Kv1.1: An integrated transcriptomic and proteomic study. *J. Biol. Chem.* 290: 12195–12209. 2015.
13. Jan L.Y., Jan Y.N. Voltage-gated potassium channels and the diversity of electrical signalling. *J. Physiol.* 590: 2591–2599. 2012.
 14. Vassilevski A.A., Kozlov S.A., Egorov T.A., Grishin E.V. Purification and characterization of biologically active peptides from spider venoms. *Methods Mol. Biol.* 615: 87–100. 2010.
 15. Kuzmenkov A.I., Sachkova M.Y., Kovalchuk S.I., Grishin E.V., Vassilevski A.A. *Lachesana tarabaevi*, an expert in membrane-active toxin. *Biochem. J.* 473: 2495–2506. 2016.
 16. Peigneur S., Billen B., Derua R., Waelkens E., Debaveye S., Béress L., Tytgat J. A bifunctional sea anemone peptide with Kunitz type protease and potassium channel inhibiting properties. *Biochem. Pharmacol.* 82: 81–90. 2011.
 17. Sali A., Blundell T.L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234: 779–815. 1993.
 18. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25: 1605–1612. 2004.
 19. Jaravine V.A., Nolde D.E., Reibarkh M.J., Korolkova Y.V., Kozlov S.A., Pluzhnikov K.A., Grishin E.V., Arseniev A.S. Three-dimensional structure of toxin OSK1 from *Orthochirus scrobiculosus* scorpion venom. *Biochemistry.* 36: 1223–1232. 1997.
 20. Kuzmenkov A.I., Peigneur S., Chugunov A.O., Tabakmakher V.M., Efremov R.G., Tytgat J., Grishin E.V., Vassilevski A.A. C-Terminal residues in small potassium channel blockers OdK1 and OSK3 from scorpion venom fine-tune the selectivity. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* 1865: 465–472. 2017.
 21. Tytgat J., Chandy K.G., Garcia M.L., Gutman G.A., Martin-Eauclaire M.F., van der Walt J.J., Possani L.D. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. *Trends Pharmacol. Sci.* 20: 444–447. 1999.
 22. The UniProt Consortium. UniProt: A worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* 47: D506–D515. 2019
 23. Romi-Lebrun R., Martin-Eauclaire M.F., Escoubas P., Wu F.Q., Lebrun B., Hisada M., Nakajima T. Characterization of four toxins from *Buthus martensi* scorpion venom, which act on apamin-sensitive Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Eur. J. Biochem.* 245: 457–464. 1997.
 24. Crest M., Jacquet G., Gola M., Zerrouk H., Benslimane A., Rochat H., Mansuelle P., Martin-Eauclaire M.F. Kaliotoxin, a novel peptidyl inhibitor of neuronal BK-type Ca(2+)-activated K⁺ channels characterized from *Androctonus mauretanicus mauretanicus* venom. *J. Biol. Chem.* 267: 1640–1647. 1992
 25. Garcia M.L., Garcia-Calvo M., Hidalgo P., Lee A., MacKinnon R. Purification and characterization of three inhibitors of voltage-dependent K⁺ channels from *Leiurus quinquestriatus* var. *hebraeus* venom. *Biochemistry.* 33: 6834–6839. 1994.
 26. Grishin E.V., Korolkova Y.V., Kozlov S.A., Lipkin A.V., Nosyreva E.D., Pluzhnikov K.A., Sukhanov S.V., Volkova T.M. Structure and function of the potassium channel inhibitor from black scorpion venom. *Pure Appl. Chem.* 68: 2105–2109. 1996.
 27. Renisio J.G., Romi-Lebrun R., Blanc E., Bornet O., Nakajima T., Darbon H. Solution structure of BmKTX, a K⁺ blocker toxin from the Chinese scorpion *Buthus Martensi*. *Proteins.* 38: 70–78. 2000.
 28. Gao B., Peigneur S., Tytgat J., Zhu S. A potent potassium channel blocker from *Mesobuthus eupeus* scorpion venom. *Biochimie.* 92: 1847–1853. 2010.
 29. Koschak A., Bugianesi R.M., Mitterdorfer J., Kaczorowski G.J., Garcia M.L., Knaus H.G. Subunit composition of brain voltage-gated potassium channels determined by hongotoxin-1, a novel peptide derived from *Centruroides limbatus* venom. *J. Biol. Chem.* 273: 2639–2644. 1998.
 30. Cotton J., Crest M., Bouet F., Alessandri N., Gola M., Forest E., Karlsson E., Castañeda O., Harvey A.L., Vita C., Ménez A. A potassium-channel toxin from the sea anemone *Bunodosoma granulifera*, an inhibitor for Kv1 channels. Revision of the amino acid sequence, disulfide-bridge assignment, chemical synthesis, and biological activity. *Eur. J. Biochem.* 244: 192–202. 1997.
 31. Kuzmenkov A.I., Nekrasova O.V., Peigneur S., Tabakmakher V.M., Gigolaev A.M., Fradkov A.F., Kudryashova K.S., Chugunov A.O., Efremov R.G., Tytgat J., Feofanov A.V., Vassilevski A.A. KV1.2 channel-specific blocker from *Mesobuthus eupeus* scorpion venom: Structural basis of selectivity. *Neuropharmacology.* 143: 228–238. 2018.
 32. Banerjee A., Lee A., Campbell E., Mackinnon R. Structure of a pore-blocking toxin in complex with a eukaryotic voltage-dependent K(+) channel. *Elife.* 2: e00594. 2013.

Pharmacological Characterisation of MeKTx13-2 and MeKTx13-3, Peptide Ligands of Potassium Channels from the Scorpion *Mesobuthus eupeus* Venom

A. I. Kuzmenkov^a, S. Peigneur^b, J. Tytgat^b, A. A. Vassilevski^{a, *}

^a*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^b*KU Leuven, Leuven, Belgium*

**e-mail: avas@ibch.ru*

Abstract—Scorpion toxins that block potassium channels currently serve as indispensable molecular research tools in neuroscience. However, there is a grave shortage of compounds that selectively act on particular channel isoforms. Earlier, from the venom of the Central Asian scorpion *Mesobuthus eupeus*, we have isolated a number of toxins that act on voltage-gated potassium channels. Now, we have studied the activity of two similar *M. eupeus* toxins, named MeKTx13-2 and MeKTx13-3, on a panel of potassium channels and found that they are characterized by a selective effect on the K_v1.1 isoform, the expression of which is characteristic of the central nervous system of mammals. We believe that our results will allow to obtain derivatives of toxins with increased selectivity for K_v1.1, which will be in demand in studies of the nervous system.

Keywords: ion channel, potassium channel, toxin, scorpion, venom, Kv, KTx

ЦИТИРОВАТЬ:

Кузьменков А.И., Пеньёр С., Титгат Я., Василевский А.А. Фармакологическая характеристика пептидных лигандов калиевых каналов MeKTx13-2 и MeKTx13-3 из яда скорпиона *Mesobuthus eupeus*. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 105(11): 1452–1462.

DOI: 10.1134/S0869813919110074

TO CITE THIS ARTICLE:

Kuzmenkov A.I., Peigneur S., Tytgat J., Vassilevski A.A. Pharmacological Characterisation of MeKTx13-2 and MeKTx13-3, Peptide Ligands of Potassium Channels From the Scorpion *Mesobuthus eupeus* Venom. Russian Journal of Physiology. 105(11): 1452–1462.

DOI: 10.1134/S0869813919110074